

Université de Montréal

Interaction entre le récepteur GABA_{B1} et le canal potassique Kir 3

par
Martin David

Département de biochimie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître es sciences (M. Sc) en biochimie

Avril 2006

© Martin David, 2006



AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Interaction entre le récepteur GABA_{B1} et le canal potassique Kir 3

présenté par :
Martin David

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président rapporteur : Michel Bouvier

Directeur de la recherche : Terence E. Hébert

Membre du jury : Bruce G. Allen

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	3
LISTE DES TABLEAUX.....	5
LISTE DES FIGURES	6
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	7
REMERCIEMENTS.....	8
Résumé.....	10
Summary	11
CHAPITRE 1. INTRODUCTION ET REVUE DE LITTÉRATURE	12
1.1 Perspective historique de la signalisation cellulaire	13
1.2 Les différents récepteurs membranaires	13
1.3 Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG).....	14
1.3.1 Importance physiologique.....	14
1.3.2 Structure et classification des RCPG	15
1.3.3 Fonctionnement des RCPG.....	17
1.3.4 Récepteur du GABA	21
1.3.6 Régulation du récepteur GABA-B.....	27
1.4 Canaux potassiques à rectification entrante.....	28
1.4.1 Diversité des canaux potassiques.....	28
1.4.2 Canaux potassiques à rectification entrante de la famille 3	29
1.4.3 Fonctionnement des GIRK	31
1.5 Complexe de signalisation	32
1.5.1 Modèle théorique de la signalisation	32
1.5.2 Modèle de la rhodopsine	33
1.5.3 Complexe protéique	33
1.6 Transport vésiculaire (Rab).....	35
1.7 Les protéines d'échafaudage	39
1.7.1 La spinophiline.....	39
1.8 Fondements de l'hypothèse d'étude.....	41
1.8.1 Potentiel d'un complexe protéique associé à la signalisation GABAergique..	41
1.8.2 Volet de l'étude.....	41

CHAPITRE 2. ARTICLE : Interactions between GABA _{B1} receptors and Kir 3 inwardly rectifying potassium channels.....	43
(Cell Signal. 2006 Dec;18(12):2172-81)	43
Abstract	45
Introduction.....	46
Materials and methods	48
Results.....	53
Discussion	58
Figures.....	61
Figures legends	68
Acknowledgements.....	72
References.....	73
CHAPITRE 3. RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES	76
3.1 Résultats supplémentaires	77
3.1.1 Existence d'un homodimère GABA _{B1}	77
3.1.2 Interaction <i>in vitro</i> de la spinophiline avec GABA _{B1}	81
CHAPITRE 4. DISCUSSION GÉNÉRALE	86
4.1 Caractérisation des complexes de signalisation GABAergiques	87
4.1.1 Interaction du récepteur avec l'effecteur	87
4.1.2 Interaction du récepteur avec la protéine G	88
4.1.3 Itinéraire du dimère GABA _{B1-B2}	89
4.1.4 Existence d'un homodimère GABA _{B1}	89
4.1.5 Interaction du récepteur avec une protéine d'échafaudage.....	90
4.2 Directions futures.....	91
4.2.1 Sites d'interaction entre les différentes protéines	91
4.2.2 Exportation membranaire du complexe	94
4.2.3 Interaction <i>in vivo</i> de la spinophiline.....	94
4.2.4 Présence d'autres protéines.....	95
4.2.5 Effet d'un agoniste et d'un antagoniste	95
4.3 Conclusion	96
RÉFÉRENCES	97

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Différentes sous-unités des protéines G hétérotrimériques

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Effet des protéines G sur différents effecteurs

Figure 2 : Illustration de l'hétérodimère GABA_{B1-B2} et de ses principaux effecteurs

Figure 3 : Queue C-terminale de GABA_{B1}

Figure 4 : Schéma d'une sous-unité d'un canal potassique et des différentes combinaisons possibles

Figure 5 : Principales GTPases impliqués dans le trafic des vésicules

Figure 6 : Schéma de la spinophiline

Figure 7 : Le récepteur GABA_{B1} peut former un homodimère (1)

Figure 8 : Le récepteur GABA_{B1} peut former un homodimère (2)

Figure 9 : Interaction de la spinophiline avec le récepteur GABA_{B1}

Figure 10 : Co-localisation de la spinophiline avec le récepteur GABA_{B1}

Figure 11 : Co-localisation de la spinophiline avec le récepteur GABA_{B1} en présence de GABA_{B2}

Article : Interactions between GABA_{B1} receptors and Kir 3 inwardly rectifying potassium channels

Figure 1: Trafficking itinerary of GABA_{B1/B2} receptor

Figure 2: Colocalization of GABA_{B1} and Kir3.1

Figure 3: Interaction between GABA_{B1} and Kir3.1

Figure 4: Colocalization of GABA_{B1} and Kir3.2

Figure 5: Interaction between GABA_{B1} and Kir3.2

Figure 6: Localization of the receptor and heterotrimeric G protein subunits

Figure 7: Interaction of GABA_{B1} with G $\beta\gamma$ subunit

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

GABA : acide γ -amino-butyrique

GABA_A : Récepteur de type A à l'acide γ -amino-butyrique

GABA_{B1} : Récepteur de type B1 à l'acide γ -amino-butyrique

GABA_{B2} : Récepteur de type B2 à l'acide γ -amino-butyrique

FRET : *Fluorescence Resonance Energy Transfert*

BRET : *Bioluminescence Resonance Energy Transfert*

RCPG : Récepteur couplé aux protéines G

AMP : Adénosine monophosphate

AMPC : Adénosine monophosphate cyclique

GMP : Guanosine monophosphate

GTP : Guanosine triphosphate

GDP : Guanosine diphosphate

GIRK, Kir : Canaux potassique à rectification entrante activés par les protéines G

PTX : *Pertussis Toxin*

GRK : Kinases des récepteurs couplés aux protéines G

ATF4 : Facteur d'activation de la transcription 4

PPSI : potentiel post-synaptique inhibiteur

RAMP : *receptor-activity-modifying proteins*

REMERCIEMENTS

En prolongeant mes études pour faire une maîtrise en biochimie, je me lançais d'abord un défi à moi-même. Je voulais satisfaire ma curiosité par rapport à la recherche fondamentale en biologie cellulaire et apprécier un monde où les découvertes, petites et grandes, se succèdent extrêmement rapidement. Je voulais également me prouver que je pouvais poursuivre des études supérieures avec succès. Mes deux années dans ce monde m'ont fait grandir et j'en garde une expérience de vie mémorable. Certes, ces deux années ne furent pas sans embûches et j'aimerais remercier certaines personnes pour leur soutien dans ce périple.

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de recherche, Terry Hébert. Il s'agit d'un homme très bon, simple qui donne à son laboratoire une ambiance professionnelle et très agréable pour le travail. Il m'a donné une grande confiance en moi, confiance qui m'a permis de réaliser plein de belles choses.

J'aimerais aussi remercier les assistantes de recherches sans qui je n'aurais pu mener à terme mon projet de recherche. Nathalie Éthier, Julie Guimond, Catherine Lavoie et Phan Trieu ont été une source considérable d'informations et de ressources techniques, en plus d'être des filles extrêmement agréable à côtoyer. Aussi, je voudrais souligner l'importance des autres étudiants dans le laboratoire. Ils ont fait en sorte qu'il était plaisant de se lever chaque matin pour aller poursuivre mes expériences au laboratoire. Merci donc à Alessandra Baragli, Mélanie Robitaille, Denis Dupré et Maxime Richer

pour leur franche camaraderie. Enfin, un gros merci à Maya Mamarbachi et Louis Villeneuve pour leurs apports techniques au projet de recherche.

Finalement, je voudrais remercier ma famille pour son support et son appui constant durant ces deux dernières années. On se rend compte de l'importance de sa famille dans les moments plus difficiles, mais aussi dans la routine du quotidien. Ils m'ont permis d'éviter le découragement et m'ont toujours apporter un regard positif sur ce que je faisais.

Résumé

L'acide γ -aminobutyrique (GABA) est le principal neurotransmetteur inhibiteur dans le système nerveux central des cerveaux mammifères. Il agit via les récepteurs-canaux GABA-A et les récepteurs métabotropiques GABA-B. Le présent mémoire de recherche présente l'interaction entre le récepteur GABA-B et les sous-unités des canaux potassique à rectification entrante (Kir3), qui jouent aussi un rôle important dans la transmission neuronal et dans l'excitabilité membranaire. Ces canaux sont d'ailleurs contrôlés par les récepteurs GABA-B. Dans un système d'expression hétérologue, l'interaction physique possible entre GABA-B et Kir3 a été étudiée à l'aide de technique de bioluminescence (transfert d'énergie de résonance, BRET), de co-immunoprécipitation et de microscopie confocale (cette dernière pour la colocalisation seulement). Les résultats montrent que les canaux Kir3 et les sous-unités $G\beta\gamma$ des protéines G peuvent interagir avec le GABAB1, et ce, d'une manière indépendante à la présence de GABA_{B2} ou Kir3.4. Ces protéines sont cependant essentielles pour l'acheminement membranaire de leurs partenaires respectifs. De plus, les résultats montrent que les complexes de signalisation associée à GABA-B (qui comprennent le récepteur, les protéines G et les canaux potassiques Kir) sont formés peu après leur biosynthèse, vraisemblablement dans le réticulum endoplasmique.

Summary

γ -aminobutyric acid (GABA) is the principal inhibitory neurotransmitter in the mammalian brain. It acts via both ionotropic GABA-A and metabotropic GABA-B receptors. We evaluated the interaction of receptors with members of the inwardly rectifying potassium (Kir3) channel family, which also play an important role in neuronal transmission and membrane excitability. These channels are functionally regulated by GABA-B receptors. Possible physical interactions between GABA-B receptor and Kir3 channels expressed in HEK cells were evaluated using Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) experiments, co-immunoprecipitation and confocal microscopy (the latter for colocalization only). Our data indicate that Kir3 channels and G $\beta\gamma$ subunits can interact with the GABA-B₁ subunits independently of the GABA-B₂ subunit or Kir3.4 which are ultimately responsible for their targeting to the cell surface. Thus signalling complexes containing GABA-B receptors, G proteins and Kir channels are formed shortly after biosynthesis most likely in the endoplasmic reticulum.

CHAPITRE 1. INTRODUCTION ET REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Perspective historique de la signalisation cellulaire

Un des concepts les plus fondamentaux de la biologie moderne est sans l'ombre d'un doute celui de récepteur, apparu il y a bientôt 100 ans. À l'époque, les scientifiques, dont Paul Ehrlich¹, élaboraient ce concept dans le cadre de la réponse immunitaire. Ils pensaient alors que les antigènes ne pouvaient se lier aux cellules que si quelque chose les reconnaissait à la surface cellulaire. Durant le 20^e siècle, le concept de récepteur s'est répandu pour expliquer le fonctionnement des hormones, des neurotransmetteurs et d'autres molécules chimiques qui influencent le fonctionnement cellulaire. Le concept d'effecteur était élaboré parallèlement pour expliquer la régulation des différents processus par les récepteurs. Cependant, les éléments impliqués dans ce processus n'étaient pas encore identifiés.

1.2 Les différents récepteurs membranaires

Les protéines de la surface membranaire qui reçoivent les informations et messages provenant de l'extérieur de la cellule sont classées en trois grandes classes de récepteurs. Il y a tout d'abord les récepteurs-canaux. Ce sont des protéines qui possèdent un site de liaison pour une molécule d'information, mais qui ont aussi la propriété de pouvoir faire passer des ions d'un côté à l'autre de la membranaire cellulaire. Ces types de récepteurs sont souvent responsables pour les réponses cellulaires plus rapides. Il existe une deuxième classe de récepteurs qui se nomme tyrosine-kinase. Ils sont impliqués principalement dans la prolifération et la différenciation cellulaire. Ils se distinguent par leur capacité à s'auto-phosphoryler suite à la liaison du ligand. Finalement, une troisième classe de protéines peuvent permettre une intégration de l'information extracellulaire. Il

s'agit des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Ce sont de protéines transmettent l'information grâce à une famille de protéines que l'on nomme protéines G (d'où le nom des récepteurs). Ces dernières peuvent lier le GTP pour provoquer une cascade d'amplification signalétique complexe et grandement modulable.

1.3 Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

1.3.1 Importance physiologique

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) forment la plus grande famille de récepteurs membranaires impliqués dans la transduction de signaux connue à ce jour. Environ 1000 gènes codent pour des RCPG, soit l'équivalent de 3% du génome humain². Cela représente de 1 à 5% des protéines présentes dans une cellule. Ils sont donc impliqués dans de nombreux processus cellulaires tels que métabolisme, la neurotransmission, la croissance et la différenciation cellulaire, mais aussi dans les réponses immunitaires et inflammatoires. Cette diversité d'action est le résultat de la variété des signaux qui sont transmis par les RCPG. La lumière, les ions, molécules gustatives et odorantes, peptides ou protéines sont tous susceptibles d'activer un type de récepteur faisant partie de cette grande famille. À ces signaux naturels, il faut ajouter toutes les molécules chimiques artificielles créées par la science moderne pour des fins thérapeutiques. Cette importance physiologique confère à la famille des RCPG une place de choix dans la recherche biomédicale moderne ainsi que dans le développement de nouveaux agents pharmaceutiques par l'industrie.

1.3.2 Structure et classification des RCPG

Les RCPG possèdent tous une structure semblable. Ils sont composés de sept hélices α trans-membranaires qui forment un cœur hydrophobique. Ces sept hélices sont liées en alternance par des boucles intra- et extracellulaires. Les RCPG ont deux extrémités qui sont nommées N- et C-terminale, selon l'ordre de synthèse de la protéine. L'extrémité N-terminale est extracellulaire et possède des sites de glycolysation. L'extrémité C-terminale, quant à elle, est cytosolique. La structure tridimensionnelle que prennent les sept hélices transmembranaires ressemble à un baril. Cette structure a été élaborée grâce à la cristallisation de la rhodopsine³.

Au cours des dernières années, il a été démontré que plusieurs récepteurs existaient sous une forme dimérique plutôt que monomérique^{4,5,6}. Cette nouvelle réalité a provoqué l'élaboration de mécanismes de signalisation plus complexes. D'ailleurs, le récepteur du GABA (acide γ -amino-butyrique) a été l'un des premiers récepteurs à être décrit comme hétérodimère obligatoire (voir plus bas).

La famille des RCPG se divise en trois grandes classes nommées simplement I, II, III qui sont séparés selon l'organisation de leurs structures générales et la conservation de quelques éléments de séquences^{7,8}. La classe I est la plus vaste compte tenu qu'elle comprend la plupart des récepteurs pour les odeurs. Elle est caractérisée par plusieurs résidus qui sont compris dans les hélices transmembranaires, mais aussi par une cystéine palmitylée dans l'extrémité C-terminale. Cette classe se divise en trois groupes selon le site de liaison du ligand sur le récepteur. Le groupe Ia est formé de récepteurs qui ont un

site de liaison dans le puit qui est formé par les sept hélices trans-membranaires. Ce groupe, dont font partie la rhodopsine et les récepteurs β -adrénergiques, comprend surtout des récepteurs pour des petits ligands. Les récepteurs du groupe Ib (principalement des récepteurs pour des peptides) possèdent leurs sites de liaison dans l'extrémité N-terminale. Le groupe Ic comprend des récepteurs qui vont lier leur ligand grâce à leur extrémité N-terminale plus large que les groupes Ia et Ib, mais aussi avec les boucles extracellulaires. Les récepteurs pour les hormones glyco-protéiques sont un exemple représentatif de ce groupe. Les récepteurs de la classe II ressemblent beaucoup à ceux du groupe Ic puisqu'ils possèdent aussi une extrémité N-terminale plus grande. Cependant, ils n'ont aucune homologie de séquence avec les récepteurs du groupe Ic. De plus, leur domaine N-terminal possède plusieurs cystéines qui sont conservées. Ils sont responsables pour la reconnaissance des hormones de haut poids moléculaires tels que le glucagon et la sécrétine. Des protéines possédant un domaine transmembranaire appelées RAMP (receptor-activity-modifying proteins) ont aussi un rôle dans la transmission de l'information par les RCPG de classe II puisqu'elles sont reconnues pour interagir principalement avec ces derniers.⁹ Par exemple, elles peuvent changer la sélectivité des récepteurs à la calcitonine.¹⁰ Finalement, les récepteurs de la classe III se distinguent par un domaine N-terminal encore plus grand que ceux de la classe II. Ils possèdent également une très longue queue C-terminale. On y retrouve les récepteurs des deux principaux neurotransmetteurs, le glutamate et l'acide γ -amino-butyrique (GABA), respectivement activateurs et inhibiteurs. C'est d'ailleurs sur le récepteur du GABA que porte principalement ce mémoire de maîtrise.

De plus, plusieurs RCPG sont dits orphelins. Cette nomenclature vient du fait qu'aucun ligands naturels leurs a été attribué. Ces récepteurs viennent augmenter la complexité de la signalisation par les RCPG. Par exemple, les myocytes cardiaques peuvent exprimer plus de 100 différents RCPG orphelins.¹¹

1.3.3 Fonctionnement des RCPG

Comme leur nom l'indique, les RCPG requièrent la présence de protéines liant le guanosine triphosphate (GTP) dites protéines G. Ces protéines sont des GTPases qui permettent la propagation du signal reçu par le récepteur vers les différents effecteurs. Elle est composée de trois sous-unités qui sont appelées α , β et γ . Plusieurs variants pour chaque sous-unité sont maintenant répertoriés dans la littérature. (voir tableau I)¹²

La liaison d'un ligand sur le récepteur va provoquer un changement conformationnel de ce dernier. L'interaction fonctionnelle avec la protéine G est ainsi facilitée et provoque l'échange du GDP (guanosine diphosphate) lié à la protéine G pour du GTP. Cependant, malgré la détermination de la structure de la rhodopsine à un niveau de résolution atomique, il n'est pas clair comment la spécificité de la liaison récepteur/protéine G est atteinte. De plus, il n'est pas clair comment le changement conformationnel du récepteur peut provoquer l'activation de la protéine G. L'échange de GDP pour du GTP va provoquer la dissociation partielle (changement de conformation) des sous-unités $\beta\gamma$ de la sous-unité α . Contrairement à la transducine (voir modèle de la rhodopsine), plusieurs études^{13,14,15} démontrent que les sous-unités de la protéine G conservent un certain degré

de liaison entre elles une fois activées. La caractérisation de ces sous-unités a permis de déterminer que c'est la sous-unité α qui lie le GTP et qui en fait l'hydrolyse¹⁶. La sous-unité α a été longtemps reconnue comme étant la seule pouvant influencer un effecteur, mais il est maintenant clair que la sous-unité $\beta\gamma$ peut moduler certains effecteurs¹⁷ (voir figure 1). Donc, une fois partiellement dissociées, les sous-unités α et $\beta\gamma$ vont interagir fonctionnellement avec les effecteurs (enzymes, canaux ioniques, ...). Ces effecteurs peuvent ensuite produire un second messenger comme l'AMPc, ou permettent le passage d'ions comme le potassium et le calcium.

Tableau I: Différentes sous-unités des protéines G hétérotrimériques. Tiré de Wettschureck N et al. 2005¹²

Name	Gene	Expression	Effectors ¹
α-Subunits			
G_{α_s} class			
G_{α_s}	<i>GNAS</i>	Ubiquitous	AC (all types) ↑
$G_{\alpha_{sNL}}$	(<i>GNASXL</i>)	Neuroendocrine	AC ↑
$G_{\alpha_{s40}}$	<i>GNAL</i>	Olfactory epithelium, brain	AC ↑
G_{α_i} class			
$G_{\alpha_{i1}}$	<i>GNAI1</i>	Widely distributed	AC types I,II,IV,VI,VIII,X ↓ (directly regulated)
$G_{\alpha_{i2}}$	<i>GNAL2</i>	Ubiquitous	various other effectors are regulated via $G\beta\gamma$
$G_{\alpha_{i3}}$	<i>GNAL3</i>	Widely distributed	released from activated $G_{\alpha_{i1}}$ (see below)
$G_{\alpha_{i4}}$	<i>GNAL4</i>	Neuronal, neuroendocrine	VDCU ↓, GIRK ↑ (via $G\beta\gamma$; see below)
$G_{\alpha_{i7}}$	<i>GNAL7</i>	Neuronal, platelets	AC (e.g., VVI) ↓ (directly regulated); Rap1GAP
$G_{\alpha_{i20a}}$	<i>GNAT3</i>	Taste cells, brush cells	PDE ↑?; other effectors via $G\beta\gamma$?
$G_{\alpha_{i11}}$	<i>GNAT1</i>	Retinal rods, taste cells	PDE 6 (γ -subunit rod) ↓
$G_{\alpha_{i12}}$	<i>GNAT2</i>	Retinal cones	PDE 6 (γ -subunit cone) ↓
$G_{\alpha_q/11}$ class			
G_{α_q}	<i>GNALQ</i>	Ubiquitous	PLC- β 1-4 ↑
$G_{\alpha_{11}}$	<i>GNAL1</i>	Almost ubiquitous	PLC- β 1-4 ↑
$G_{\alpha_{11}}$	<i>GNAL4</i>	Kidney, lung, spleen	PLC- β 1-4 ↑
$G_{\alpha_{11,16}}$	<i>GNAL6 (Gnat15)</i>	Hematopoietic cells	PLC- β 1-4 ↑
$G_{\alpha_{12/13}}$ class			
$G_{\alpha_{12}}$	<i>GNAL2</i>	Ubiquitous	PI3Z/RhoGEF/LARG, Btk, Gap1m, cadherin
$G_{\alpha_{13}}$	<i>GNAL3</i>	Ubiquitous	p115RhoGEF, PI3Z/RhoGEF/LARG, radixin
β-Subunits			
β_1	<i>GNB1</i>	Widely, retinal rods	AC type 1 ↓ AC types II,IV,VII ↑ PLC- β (β 1- β 2- β 1) ↑ GIRK1-4 (Kir3.1-3.4) ↑ receptor kinases (GRK 2 and 3) ↑ PI3K, β , γ ↑ T-type VDCU (Ca _v 3.2) ↓ (G β γ 2) N- β Q,R-type VDCU (Ca _v 2.1-2.3) ↓
β_2	<i>GNB2</i>	Widely distributed	
β_3	<i>GNB3</i>	Widely, retinal cones	
β_4	<i>GNB4</i>	Widely distributed	
β_5	<i>GNB5</i>	Mainly brain	
γ-Subunits			
γ_{12} , γ_{10a}	<i>GNGT1</i>	Retinal rods, brain	}
γ_{11a} , γ_{10b}	<i>GNGT2</i>	Retinal cones, brain	
γ_2 , γ_{10c}	<i>GNG2</i>	Widely	
γ_3	<i>GNG3</i>	Brain, blood	
γ_4	<i>GNG4</i>	Brain and other tissues	
γ_5	<i>GNG5</i>	Widely	
γ_6	<i>GNG7</i>	Widely	
γ_8 , γ_9	<i>GNG8</i>	Olfactory/vomerolnasal epithelium	
γ_{10a}	<i>GNG10</i>	Widely	
γ_{11}	<i>GNG11</i>	Widely	
γ_{12}	<i>GNG12</i>	Widely	
γ_{13}	<i>GNG13</i>	Brain, taste buds	

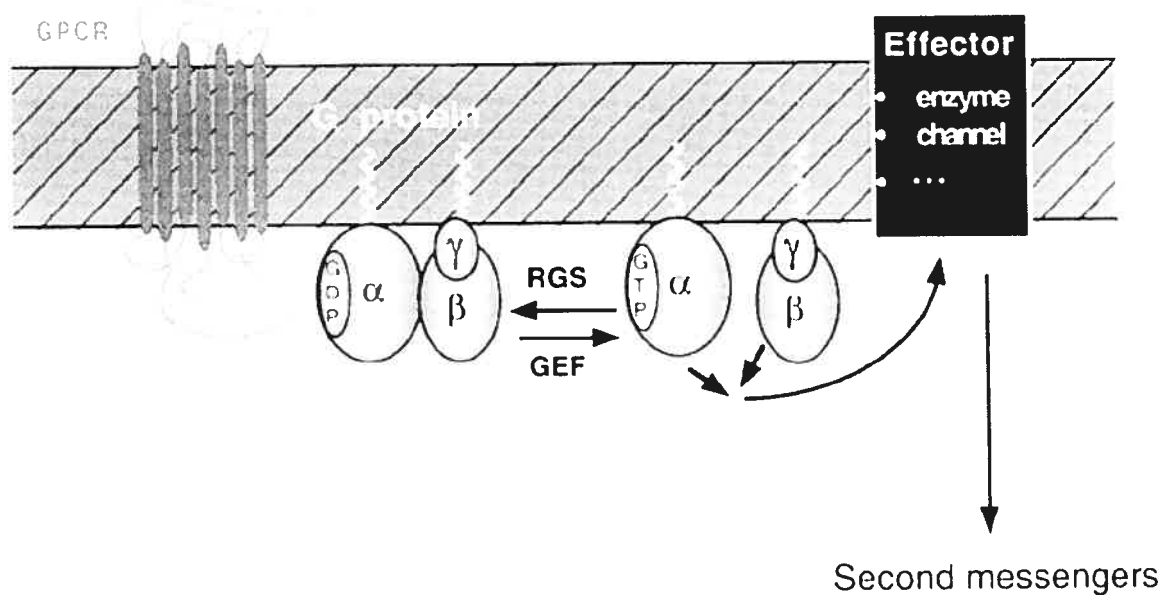


Figure 1 : Effet des protéines G sur différents effecteurs. Tiré de De Vries et al, 2000¹⁸

1.3.4 Récepteur du GABA

L'acide γ -amino-butérique (GABA) est le principal neurotransmetteur inhibiteur dans le système nerveux central des cerveaux mammifères. En effet, le cerveau (hippocampe et cortex cérébral) possède des mécanismes pour réguler le passage de l'influx nerveux d'un neurone à l'autre. La génération de potentiels post-synaptiques inhibiteurs (PPSI) est un de ces mécanismes qui permet d'inhiber les synapses. Le GABA joue un rôle très important dans le contrôle de la génération de ces PPSI¹⁹. Ce rôle est divisé temporellement en deux composantes. La première est dite précoce et implique les récepteurs GABA_A. Les récepteurs GABA_A ne sont pas des RCPG, mais plutôt des récepteurs-canaux, qui, une fois activés, permettent le passage d'ions Cl^- et HCO_3^- . Ce passage d'ions génère une hyperpolarisation rapide de la membrane plasmique. La deuxième composante dans la génération de PPSI par le GABA est dite tardive et implique les récepteurs GABAB, récepteurs qui font partie de la famille des RCPG, classe III. Une fois activés, ils permettent une augmentation de la conductibilité des ions K^+ en influençant les canaux Kir3 (canaux potassique à rectification entrante).^{20, 21} Étant donné leur localisation sous-cellulaire, ces récepteurs peuvent moduler la transmission synaptique autant au niveau pré-synaptique qu'au niveau post-synaptique. Leur rôle demeure le même, c'est-à-dire inhiber la transmission synaptique, mais le mécanisme est différent. Du côté post-synaptique, ils provoquent un PPSI long et durable, alors que du côté pré-synaptique, ils vont diminuer la relâche de neurotransmetteur²².

Un dysfonctionnement de la transmission synaptique régulée par le GABA dans le système nerveux central est associé à plusieurs pathologies. Par exemple, une

hypoactivité du système GABA peut être reliée à l'épilepsie, l'anxiété, le stress, la dépression et les problèmes de sommeil. Au contraire, une hyperactivité du système est associée à la schizophrénie.²³

1.3.5 Structure et fonction du récepteur GABA-B

Comme les autres RCPG, le récepteur GABA comporte sept passages transmembranaires. Il fait partie de la classe III et il possède donc également un domaine extracellulaire assez imposant. Une des caractéristiques distinctives du récepteur est le fait qu'il fonctionne seulement sous forme d'hétérodimère obligatoire. En effet, il existe deux monomères différents que l'on nomme GABA_{B1} et GABA_{B2}, qui forme l'hétérodimère fonctionnel à la membrane plasmique.

GABA_{B1} est une protéine de 960 acides aminés. Plusieurs isoformes²⁴ se retrouvent dans la nature, mais deux formes majoritaires du GABA_{B1} ont été identifiées chez les espèces étudiées²⁵. Il s'agit de GABA_{B1a} et GABA_{B1b}. La principale différence entre les deux isoformes se situe dans la partie N-terminale. En effet, les 147 premiers acides aminés de GABA_{B1a} sont absents dans GABA_{B1b} et remplacés par une petite séquence de 18 acides aminés. De plus, les deux isoformes semblent avoir une localisation spatio-temporelle différente²⁶. GABA_{B1a} semble plus présent dans une petite couche cellulaire du cervelet tandis que GABA_{B1b} est présent dans les fibres de Purkinje. Cette différence de localisation peut sous-entendre une différence dans les rôles joués par les deux isoformes, bien que rien ne soit encore démontré à ce sujet.

Historiquement, le monomère GABA_{B1} a été cloné en premier²⁷, mais lorsqu'il était exprimé dans un système hétérologue, aucun effet caractéristique de l'activation GABA_B n'était observable. Bien que GABA_{B1} soit capable de lier l'acide γ -amino-butyrique, des études ont démontrés que la queue C-terminale du récepteur contenait un motif (RSRR) de rétention au réticulum endoplasmique^{28,29,30}. De plus, des études démontrent qu'il est incapable d'activer les protéines G³¹. Une seconde protéine, GABA_{B2}, fut clonée en 1998^{32,33}. Elle contient 941 acides aminés et elle présente une homologie de 35% avec GABA_{B1}. GABA_{B2} possède des caractéristiques distinctes de GABA_{B1}. Effectivement, GABA_{B2} ne contient pas de motif de rétention pour le réticulum endoplasmique et se rend donc à la membrane cytoplasmique. Cependant, cette protéine est incapable de lier le ligand GABA, bien qu'elle puisse activer les protéines G³⁴. Les chercheurs ont donc proposer un modèle qui impliquerait l'hétérodimérisation de GABA_{B1} et GABA_{B2} pour former un récepteur fonctionnel à la membrane plasmique. Le modèle proposé permettrait à GABA_{B1} de lier l'agoniste et à GABA_{B2} d'engendre la signalisation cellulaire. L'hétérodimère se formerait suite à l'interaction des queues C-terminales des deux monomères sur une séquence d'environ 30 acides aminés qui sont susceptibles de former des motifs *coiled-coil*³⁵. L'interaction entre ces deux motifs permet de cacher le motif RSRR de rétention au RE de GABA_{B1}, permettant ainsi son acheminement à la membrane cellulaire. L'interaction de ces motifs est le déterminant de l'hétérodimérisation, mais ce n'est pas la seule interaction qui existe entre GABA B1 et GABAB2. D'autres interactions, notamment entre les domaines N-terminaux jouent aussi un rôle important dans la dimérisation de GABA_{B1} et GABA_{B2}. De plus, la queue C-terminale de GABA_{B1} possède d'ailleurs plusieurs sites d'interaction pour d'autres

protéines comme le montre la figure 3. Un des sites liaisons intéressant est le motif pour les protéines à domaine PDZ, à la toute fin de la queue C-terminale. Aussi, la queue C-terminale pourrait être impliquée dans un homodimère de GABA_{B1}. En effet, plusieurs régions du cerveau et types cellulaires^{36,33} où l'expression de GABA_{B1} est beaucoup plus grande que celle de GABA_{B2}, laissant croire à la possible existence d'un récepteur homodimérique GABA_{B1} à l'intérieur de la cellule ou à l'existence d'une autre sous-unité du récepteur qui n'est pas encore découverte et qui peut interagir avec GABA_{B1}, comme le fait GABA_{B2}. L'interaction entre les unités de GABA_{B1} se ferait potentiellement via la queue C-terminale.

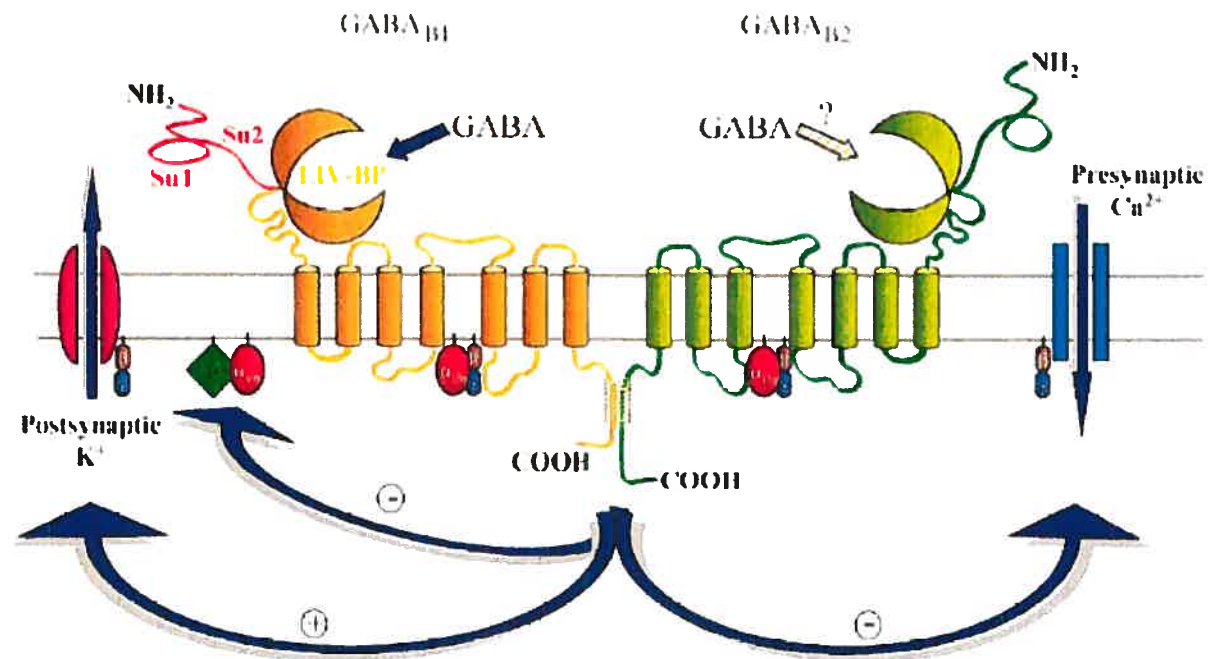


Figure 2 : Illustration de l'hétérodimère GABA_{B1}-B2 et de ses principaux effecteurs connus. La molécule GABA se lierait à GABA_{B1} lorsque ce dernier serait amené à la membrane cellulaire par GABA_{B2} et provoquerait les différents effets montrés (positifs ou négatifs). Tiré de Couve A et al, 2000³⁷

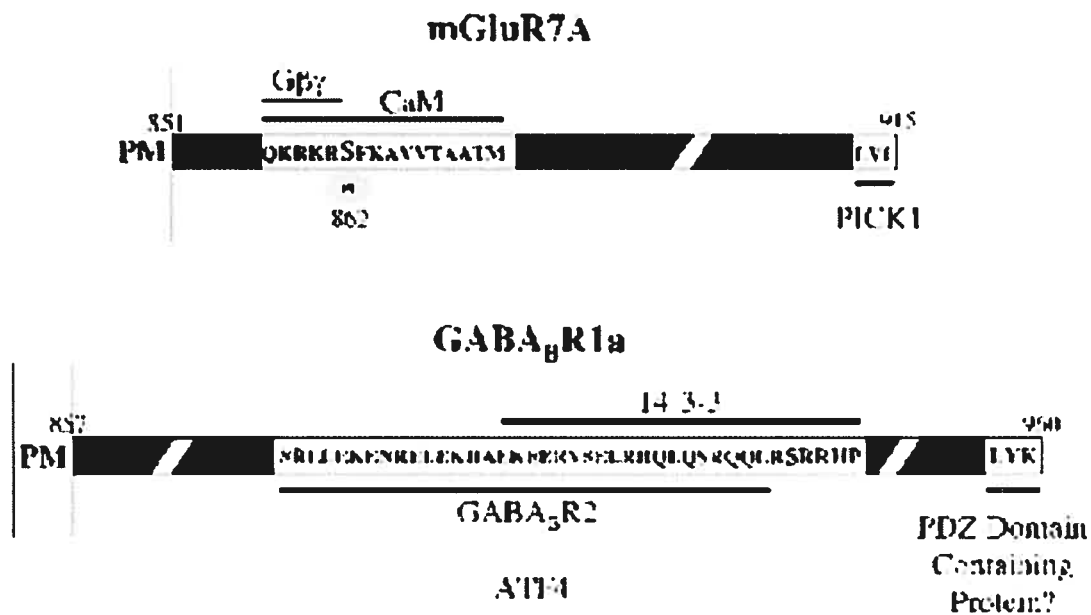


Figure 3 : Queue C-terminale de GABA_{B1}. La partie C-terminale de GABA_{B1} est capable de lier plusieurs autres protéines tel que GABA_{B2}, le facteur de transcription ATF4, la protéine d'échafaudage 14-3-3. Elle contient aussi un motif de liaison pour les protéines à motif PDZ.

1.3.6 Régulation du récepteur GABA-B

Comme mentionné plus haut, la stimulation du récepteur provoque plusieurs réponses cellulaires. D'une façon simultanée, les processus impliqués dans l'efficacité de la signalisation et dans la désensibilisation du récepteur entrent en jeu. La désensibilisation homologue du récepteur fait partie de ces phénomènes. Elle consiste à la baisse de réponse du récepteur suite à la présence prolongée d'un stimulus. Pour plusieurs RCPG, ce processus est contrôlé par deux familles de protéines : les kinases des récepteur couplés aux protéines G (*GRK : G-protein receptor kinases*) et les arrestines.³⁸ Selon le modèle actuel, les GRK pourraient se lier spécifiquement aux récepteurs occupés par un agoniste et provoquer leur phosphorylation. Cette phosphorylation augmenterait l'affinité du récepteur pour l'arrestine. La liaison de l'arrestine au récepteur préviendrait la liaison de la protéine G au récepteur en plus de provoquer l'endocytose du récepteur par des puits de clathrines.^{39,40,41} La famille des GRK comprend sept membres, nommés GRK1 à 7. Elles sont divisées en trois sous-familles selon leurs homologies de séquences⁴² : GRK1 (la kinase de la rhodopsine) et GRK7, GRK2 et 3 (β ARK kinases) et finalement, GRK4, 5 et 6 (la sous-famille GRK4). Il est important de noter que GRK 4 est principalement retrouvée dans le cerveau et les reins.^{43,44} Bien que le rôle des GRK soient évidents pour la désensibilisation des RCPG de classes I et II, leur rôle est moins évident pour les récepteurs de classe III, classe dont fait partie le récepteur GABA_B. Cependant, en effet, il semblerait que GRK4 jouerait un rôle important dans la désensibilisation du récepteur GABA_B⁴⁵ selon un mécanisme atypique qui n'impliquerait pas d'augmentation de la phosphorylation du récepteur.

1.4 Canaux potassiques à rectification entrante

1.4.1 Diversité des canaux potassiques

Le potentiel membranaire est très important pour permettre aux cellules d'être excités et de propager un signal. Plusieurs ions réussissent à former ce potentiel par leur présence de part et d'autre de la membrane cellulaire. Différents canaux ioniques sont responsables pour l'entrée et la sortie de ces différents ions. Outre l'ion sodium Na^+ , l'ion potassium K^+ est très important pour contrôler l'excitabilité cellulaire des neurones. Il existe des canaux potassiques qui sont sensibles au voltage. Ces canaux vont répondre par un passage d'ions K^+ lorsque le potentiel membranaire de la cellule change. Cependant, il existe aussi des canaux qui vont pouvoir répondre à une stimulation extracellulaire, via un récepteur membranaire. C'est le cas des protéines de la famille Kir (canal potassique à rectification entrante), qui forment des canaux qui sont responsables de la sortie de potassium.

La famille Kir se divise en sept classes de canaux, nommés de 1 à 7, qui peuvent être différenciés par leurs capacités de rectification du courant et par leurs réponses à différents signaux cellulaires. Comme mentionné plus haut, les protéines qui sont influencées par les protéines G peuvent être de plusieurs natures. Les canaux ioniques sont une des classes protéiques qui peuvent être affectées par la signalisation associée aux protéines G. Les canaux potassiques Kir3 ou GIRK (G protein regulated inward-rectifier) font partie de ces canaux. Dans les cardiomyocytes, les récepteurs muscariniques, qui font partie des GPCR, activent les canaux Kir3, ce qui provoque une hyperpolarisation de la membrane

plasmique et une bradycardie. Dans les neurones, l'hyperpolarisation provoquée par ces mêmes canaux est responsable pour l'inhibition de la transmission synaptique.

1.4.2 Canaux potassiques à rectification entrante de la famille 3

Il existe quatre gènes mammifères différents qui codent pour les canaux Kir3 (nommés Kir3.1-Kir3.4 ou GIRK1-GIRK4). Ils possèdent entre 60 et 80% d'identité. Pour être fonctionnels, les canaux doivent être formés un tétramère. Ce dernier est composé de deux homodimères. Différentes combinaisons sont possibles et sont retrouvées. Tout d'abord, il convient de mentionner que l'homodimère Kir3.1 a la particularité de ne pas se rendre à la membrane plasmique par lui-même. Il reste plutôt dans le réticulum endoplasmique. En effet, Kir3.1 ne possède pas de signal pour son exportation vers la membrane plasmique.⁴⁶ Kir3.2 et Kir 3.4 peuvent s'assembler avec Kir3.1 pour former un tétramère fonctionnel à la membrane cellulaire. De son côté, l'association de Kir3.3 avec Kir3.1 semble les diriger vers les lysosomes. En effet, il a été démontré que Kir3.3 possède signal⁴⁶ qui le dirige vers ces organelles qui sont impliquées dans la dégradation protéique. L'existence de Kir3.3 laisse supposé que la cellule peut contrôler le nombre de canaux fonctionnels à la surface cellulaire. Comme le montre la figure 4, il semble que Kir3.3 puisse seulement interagir avec Kir3.1. Aussi, bien que des tétramères Kir3.2 ou 3.4 soient présents en tissus natifs,⁴⁷ leurs cinétiques d'ouverture en système d'expression hétérologue différent de celle observée en tissus natifs.⁴⁸ De plus, la figure 4 résume les combinaisons possibles existantes pour former un tétramère Kir.

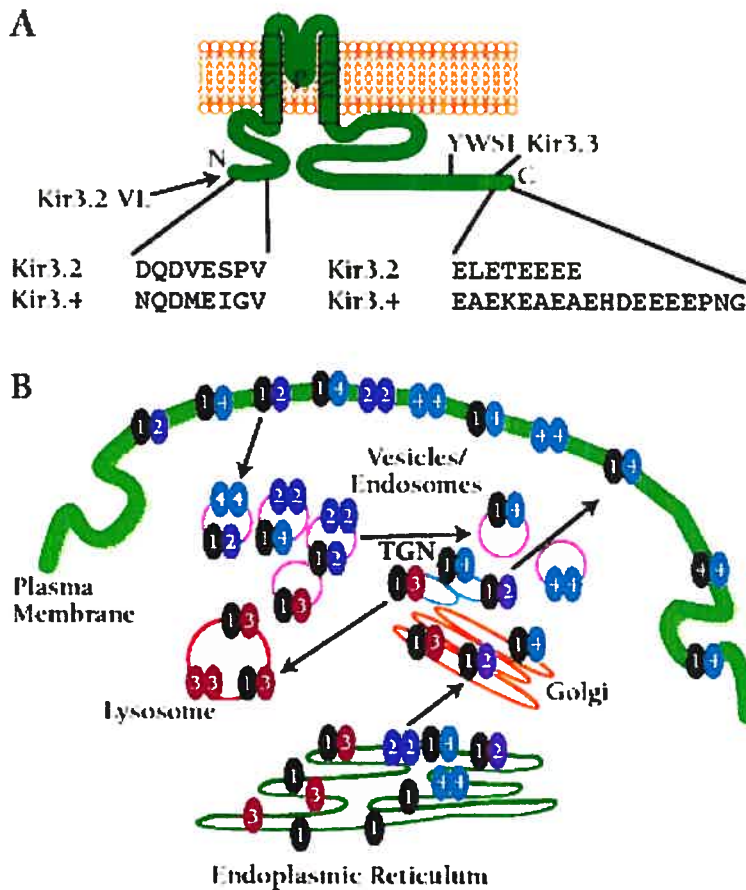


Figure 4 : Schéma d'une sous-unité d'un canal potassique et des différentes combinaisons possibles. Quatre sous-unités sont requises pour former un canal fonctionnel. Différentes combinaisons d'homodimères sont possibles, mais elles ne possèdent pas toutes la même destination et la même fonctionnalité. Tiré de Mirshahi T et al, 2002⁴⁹

1.4.3 Fonctionnement des GIRK

L'activation des canaux GIRK par un RCPG semble se faire autant par la sous-unité α que les sous-unités $\beta\gamma$. En effet, la transmission du signal de l'acétylcholine vers les GIRK est sensible à la *pertussis toxin* (PTX). Cette sensibilité provient du fait que cette toxine empêche la signalisation via les sous-unités $G\alpha_i$ ou $G\alpha_o$ et démontre donc que $G\alpha$ est impliqué. Cependant, l'application de sous-unités libres de $G\beta\gamma$ sur des membrane contenant des canaux GIRK provoque l'activation du canal alors que l'application de la sous-unité $G\alpha$ lié à du GTP n'avait aucun effet.⁵⁰ Cette découverte montra que les sous-unités $G\beta\gamma$ avaient bel et bien un rôle dans l'activation des différents effecteurs contrôlés par les RCPG. Conformément au modèle proposé pour la signalisation via les RCPG, la terminaison du signal se fait quand la sous-unité α hydrolyse le GTP en GDP et se réassocie avec $G\beta\gamma$.⁵¹ La grande similarité entre les différents GIRK suggère qu'il existe plus d'un site d'association pour $G\beta\gamma$. La stoechiométrie d'association suggère effectivement qu'il existe quatre sites pour $G\beta\gamma$ sur chaque canal.⁵² Tous les canaux potassiques sont très semblables dans leurs structures. Il est donc grandement possible que leurs fonctionnements d'ouverture et de fermeture soient similaires. La cristallisation des canaux potassiques KcsA and MthK bactériens suggère que les canaux potassiques s'ouvrent avec la rotation et le repliement du second passage transmembranaire.^{53,54,55} Une glycine extrêmement conservée sert de charnière pour le repliement de cette hélice transmembranaire. Cette « dilatation » du deuxième passage transmembranaire permet le passage des ions K^+ .⁵³

1.5 Complexe de signalisation

1.5.1 Modèle théorique de la signalisation

La théorie classique de la propagation du signal suite à la liaison du ligand sur le récepteur veut que toutes les protéines soient libres de mouvement dans la membrane plasmique. Une fois activé, le récepteur va aller provoquer l'échange du GDP pour du GTP par la protéine G, en plus de sa dissociation. Les différentes sous-unités sont ensuite responsables pour l'activation d'une foule d'effecteurs. L'hydrolyse du GTP va provoquer la terminaison du signal et toutes les protéines vont être en mesure de subir un autre cycle d'activation.

Un tel contexte théorique soulève plusieurs questions. D'abord, étant donné le nombre de sous-unités de protéine G et les différents effecteurs impliqués, il est légitime de se demander comment la cellule peut assurer la spécificité d'un signal. En effet, selon les types cellulaires, différents RCPG sont présents et sont susceptibles d'activer les mêmes sous-unités de protéines G qui, à leur tour, sont impliquées dans l'activation des différents effecteurs.

Une deuxième question qui ressort de ce cadre théorique est la rapidité avec laquelle un signal peut être transmis. Les réponses cellulaires aux différents messagers chimiques se doivent, en plus d'être précises, d'être rapides. On a qu'à penser à la transmission synaptique entre deux neurones. Hors, étant donné la surface cellulaire très grande par rapport aux récepteurs et aux différentes autres protéines impliquées, il est difficile de

concevoir que les partenaires puissent se déplacer assez vite pour assurer la vitesse requise.

À ces deux problèmes, on peut ajouter la terminaison du signal et la reformation de la protéines G hétérotrimérique.

1.5.2 Modèle de la rhodopsine

Le modèle théorique évoqué plus haut peut cependant très bien s'appliquer dans un système où un seul récepteur, une seule protéine G et un seul effecteur sont présents, comme celui de la rhodopsine.

La rhodopsine est un RCPG retrouvé dans le segment extérieur des cellules *rod* de la rétine de l'œil. L'absorption d'un photon provoque le changement conformationnel de la protéine, ce qui permet de découvrir le site de liaison pour la protéine G appropriée, la transducine (Gt)^{56,57,58}. Une fois activée, la sous-unité α active une phosphodiesterase qui transforme le GMP-cyclique en GMP. Des canaux ioniques sensibles au GMP se ferment, provoquant une hyperpolarisation de la cellule, initiant ainsi le signal nerveux de la rétine jusqu'au cerveau.

1.5.3 Complexe protéique

Plusieurs hypothèses et évidences expérimentales tendent à démontrer que les protéines membranaires ne seraient pas aussi libres qu'on pourrait le croire. Un des moyens pour pouvoir assurer une certaine spécificité dans la signalisation est la présence de différence

dans la composition lipidique et protéique de la membrane cytoplasmique. Plusieurs résultats expérimentaux ont récemment identifiés certains sous-domaines dans la membrane plasmique. Plus particulièrement, radeaux lipidiques, des domaines enrichis en cholestérol/sphingolipides et les caveolae sont susceptibles de créer des domaines pour regrouper les différents éléments de la signalisation associée aux RCPG. Les caveolae sont des invaginations de la membrane cytoplasmique de 50 à 100 nm qui contiennent la protéine caveoline. Par exemple, les cardiomyocytes possèdent des sous-domaines membranaires comme les caveolae et les radeaux lipidiques qui sont responsables pour la compartimentation des différentes actions de l'AMPc, un second messager de la signalisation associée aux RCPG.⁵⁹

Un autre moyen de la cellule pour assurer la rapidité et la spécificité de la signalisation est l'existence de protéines d'échafaudage. Ces protéines sont définies comme des protéines qui peuvent s'associer avec deux ou plusieurs partenaires et qui augmentent l'efficacité (rapidité) et la spécificité des voies de signalisation. Il existe plusieurs classes différentes de protéines d'échafaudage. Les RCPG peuvent s'associer avec les protéines d'échafaudage cytoplasmique avec l'un des trois boucles intracellulaires ou avec l'extrémité C-terminale. Ces différentes protéines d'échafaudage permettent de lier avec les autres membres de la voie de signalisation.

Bien que la compartimentation des différentes protéines et l'existence de protéines d'échafaudage puissent suggérer des solutions pour la rapidité de la signalisation, il n'en demeure pas moins que la notion de spécificité reste encore difficile à cerner. Comme

mentionné plus haut, il est de plus en plus clair que les RCPG fonctionnent sous une forme dimérique. L'interaction entre deux protéines est un moyen d'assurer le lien fonctionnel entre ces deux protéines. Il est donc logique de penser qu'on peut retrouver des interactions entre des protéines qui sont impliquées dans la signalisation cellulaire. Expérimentalement, des interactions entre les RCPG et les sous-unités des protéines G ont déjà été observées, et ce peu importe si le récepteur a été activé.^{60,61,62,63,64,65} De la même manière, des interactions stables entre les sous-unités des protéines G et avec les effecteurs ont également été observées. Plusieurs études récentes qui utilisent des techniques de transfert d'énergie de résonance fluorescente et bioluminescente (respectivement FRET et BRET) démontrent que les sous-unités de la protéine G^{15,66}, les récepteurs¹³ et les effecteurs⁶⁷ restent ensemble lors du processus de signalisation. (Pour une revue complète sur les complexes protéiques impliqués dans la transmission de l'information, voir Hébert TE, 2006⁶⁸ et Plfeger KD, 2006⁶⁹)

1.6 Transport vésiculaire (Rab)

Le trafic des protéines intracellulaires et des lipides est un processus fondamental pour la création des membranes spécialisées des différentes organelles, mais aussi pour la communication entre elles. De plus, la régulation de l'activité des GPCR semble très liée aux événements de trafic des protéines. Une des formes de communication entre ces organelles est le transport vésiculaire (voir figure 5).⁷⁰ Les protéines Rab sont des GTPases de la superfamille Ras.^{71, 72} Bien qu'intrinsèquement insolubles, les Rabs peuvent s'associer avec la face cytoplasmique des membranes des organelles grâce à une addition d'isoprénolide.⁷³ Comme les autres GTPases, les Rabs servent d'interrupteur

moléculaire qui oscille entre la forme active (lié au GTP) et la forme inactive (lié au GDP). Dans la forme active, les Rabs peuvent recruter des protéines dites effectrices qui vont se lier à la membrane cytoplasmique des organelles. Le recrutement de telles protéines par les Rabs permet de contrôler les principales étapes du transport vésiculaire. Une fois l'hydrolyse du GTP complétée, les Rabs seront dans la forme inactive et les protéines effectrices vont se dissocier. Les Rabs vont décrocher de la membrane et être recyclé.⁷⁴ Il existe plusieurs Rab qui trouvent leurs rôles à différents endroits de la voie vacuolaire centrale. Ces GTPases sont donc susceptibles d'être importante pour assurer le bon cheminement des protéines de la signalisation cellulaire telles que les RCPG, les protéines G et les protéines effectrices (canaux, adénylyl cyclase, etc.). D'ailleurs, il a été démontré que Rab 1, une GTPase responsable du transport entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, avait un rôle dans l'acheminement et le fonctionnement des récepteurs β -adrénergiques et $\alpha 1$ -adrénergique dans les myocytes ventriculaires de rat.⁷⁵ Parmi les GTPases les plus importantes, on note Rab 1 et 2, des GTPases qui permettent l'exportation des vésicules du réticulum endoplasmique au compartiment *cis*-Golgi.⁷¹ Rab 6, quant à lui, sert aux déplacements trans-Golgi. Aussi, il existe des GTPases pour les mouvements rétrogrades tels que Rab 5 et 7, qui dirigent les vésicules formées à la membrane cellulaire vers les lysosomes. Le recyclage des vésicules provenant de la membrane plasmique est aussi possible grâce à Rab 4 et 11. Il faut cependant noter qu'il existe plusieurs voies possibles pour les protéines de se rendre à la membrane plasmique et d'en revenir. En effet, il existe une redondance parmi les protéines GTPases retrouvées dans la cellule. Il est donc possible que certaines protéines

destinées à la membrane plasmique empruntent des chemins différents, en fonction des protéines qui lui sont associées ou du type cellulaire impliqué.

Bien que la régulation de l'activité des GPCR soit liée aux événements de trafic des protéines, le cheminement du récepteur et de ses partenaires de signalisation vers la membrane plasmique n'est pas encore bien caractérisé. Cependant, il semble exister des points de vérification dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi où des protéines chaperones peuvent interagir avec ces derniers.⁷⁶ Comme l'hétérodimère GABA-B est assemblé au réticulum endoplasmique²⁸, il serait intéressant d'évaluer le cheminement de cet hétérodimère et de constater où est assemblé le complexe de signalisation complet (récepteur/protéine G/effecteur).

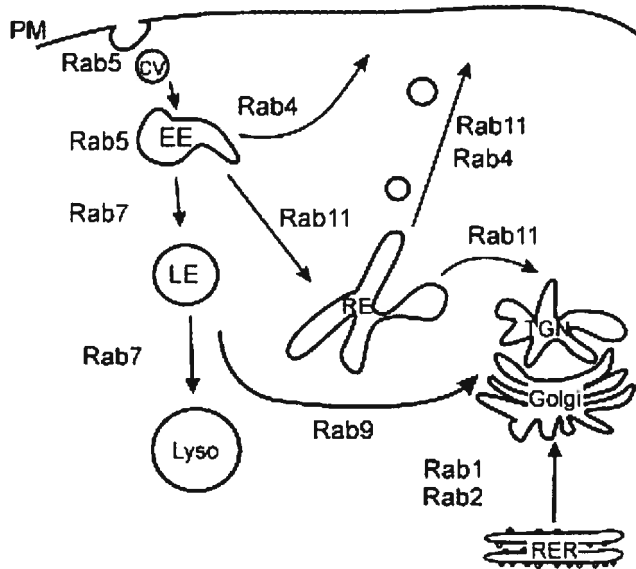


Figure 5 : Principales GTPases impliqués dans le trafic des vésicules. Les principales protéines destinées à la membrane plasmique ou à la sécrétion en-dehors de la cellule voyagent à travers différentes organelles et vésicules à l'intérieur de la cellule. La formation de ces vésicules est sous le contrôle de GTPases dont font partie les Rab. Tiré de Seachrist JL et al, 2003⁷⁷

1.7 Les protéines d'échafaudage

Comme mentionné plus haut, il existe plusieurs protéines dont le rôle est de permettre la proximité de différents membres d'un complexe protéique. Ce faisant, elles augmentent l'efficacité et la spécificité de la signalisation cellulaire. Ces protéines possèdent plusieurs domaines de liaisons pour différentes autres protéines. De telles protéines facilitent l'interaction des récepteurs (tels que les RCPG) avec leurs effecteurs, permettent d'assurer la spécificité et la localisation adéquate des différentes protéines partenaires.⁷⁸ Plusieurs différents motifs peuvent servir pour l'interaction des protéines d'échafaudage avec leurs cibles. Les domaines PDZ, SH2 (Src homology 2), SH3 (Src homology 3), entre autres, sont des motifs courants qui sont associés à la signalisation cellulaire des RCPG.^{79,80,81,82,83}

1.7.1 La spinophiline

La spinophiline (aussi connue sous le nom de neurabine II) est une protéine de 817 acides aminés de 130 kDa qui est exprimée d'une façon ubiquitaire⁸⁴. Elle possède une très grande similarité d'homologie avec la protéine neurabine 1.⁸⁵ Elle fut d'abord identifiée comme une protéine capable de lier la protéine phosphatase PP1⁸⁶, protéine qui est localisée dans les dendrites (en anglais, *dendritic spines*, d'où son nom), mais aussi comme une protéine capable de lier les filaments d'actine.⁸⁵ En plus des domaines des liaisons pour les protéines mentionnées ici, la spinophiline contient un domaine PDZ (PSD-95, discs larges, ZO-1) et trois domaines *coiled-coil* dans son extrémité c-terminale⁸⁶. Le domaine PDZ est un des modules d'interaction protéique les plus courants. Il consiste en un domaine de 80 à 100 acides aminés qui reconnaît les queues C-

terminales des récepteurs membranaires et des canaux ioniques. La spinophiline a d'ailleurs été identifiée comme étant capable de lier le récepteur dopamine D2,⁸⁷ le récepteur α -adrénergique⁸⁸, en plus de bloquer l'action de la protéine arrestine sur les RCPG.⁸⁹

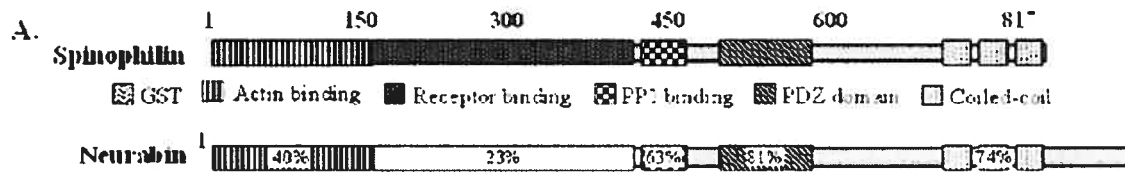


Figure 6 La spinophiline. Comme mentionné, elle possède une très grande similarité avec la protéine neurabine I et elle possède plusieurs domaines de liaisons protéiques.

Tiré de Richman JG et al, 2001⁸⁴

1.8 Fondements de l'hypothèse d'étude

1.8.1 Potentiel d'un complexe protéique associé à la signalisation GABAergique

Toutes les caractéristiques énoncées dans la revue de la littérature portent à croire qu'il serait logique et même souhaitable qu'il existe un complexe protéique entre le récepteur GABA_B, les sous-unités de la protéine G et le canal potassique Kir3 et autre protéine accessoires. D'ailleurs, il a déjà été démontré que les sous-unités G $\beta\gamma$ sont associées à des effecteurs tels que l'adénylyl cyclase et le canal potassique Kir3.1, en l'absence de stimulation d'un agoniste.⁹⁰ La présente étude vise à vérifier si un tel complexe pré-assemblé peut être associé au récepteur GABA_B. Dans cette optique, il faudra évaluer l'interaction entre le récepteur, les sous-unités de la protéine G et l'effecteur Kir3. De plus, dans l'idée que de tel complexe existe, il sera intéressant d'évaluer la présence d'autres protéines accessoires tels que la protéine d'échafaudage spinophiline.

1.8.2 Objectifs spécifiques de l'étude

L'étude aura cinq objectifs spécifiques différents. Tout d'abord, la localisation des différents partenaires de signalisation sera évaluée à l'aide de la microscopie confocale. Cette technique permet d'établir l'absence ou la présence de colocalisation entre différentes protéines. Deuxièmement, l'interaction entre les différentes protéines sera examinée à l'aide de deux techniques différentes : la co-immunoprécipitation et le transfert d'énergie de résonance par bioluminescence (BRET). Ces deux techniques sont des méthodes fiables et éprouvées pour établir une interaction (directe ou indirecte) entre deux protéines. Troisièmement, l'acheminement de l'hétérodimère GABA_B à la membrane cellulaire sera évalué à l'aide de la microscopie confocale. En sachant la voie

empruntée par l'hétérodimère GABA, nous pourrions éventuellement la comparer à la voie empruntée par les autres membres potentiels du complexe (notamment les sous-unités de la protéine G et le canal potassique Kir3). Aussi, l'interaction possible entre le récepteur GABA_{B1} avec lui-même pour former un homodimère sera vérifiée par BRET et co-immunoprécipitation. Finalement, dans le but de trouver une protéine partenaire qui pourrait avoir un rôle à jouer dans l'acheminement et la localisation du récepteur GABA, l'interaction de la queue C-terminale avec la protéine d'échafaudage spinophiline sera évaluée *in vitro* par GST-pulldown. La localisation de cette interaction potentielle sera observée par microscopie confocale.

**CHAPITRE 2. ARTICLE : Interactions between GABA_{B1} receptors and Kir 3
inwardly rectifying potassium channels**
(*Cell Signal.* 2006 Dec;18(12):2172-81)

Interactions between GABA-B₁ receptors and Kir 3 inwardly rectifying potassium channels

Cell Signal. 2006 Dec;18(12):2172-81

Martin David¹, Maxime Richer¹, Aida M. Mamarbachi², Louis R. Villeneuve², Denis J. Dupré³, Terence E. Hebert^{1,3*}

¹Département de biochimie, Université de Montréal

²Centre de recherche, Institut de Cardiologie de Montréal

³Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University

* To whom correspondence should be addressed

Terence E. Hebert
Department of Pharmacology and Therapeutics
McGill University
Room 1303 McIntyre Medical Sciences Building
3655 Promenade Sir William Osler
Montréal, Québec
H3G 1Y6
Phone : 514 398-1398
Fax : 514 398-6990
Email : [REDACTED]

Keywords: GABA, Kir 3 potassium channels, GPCR, signalling, protein trafficking

Abstract

γ -aminobutyric acid (GABA) is the principal inhibitory neurotransmitter in the mammalian brain. It acts via both ionotropic GABA-A and metabotropic GABA-B receptors. We evaluated the interaction of receptors with members of the inwardly rectifying potassium (Kir3) channel family, which also play an important role in neuronal transmission and membrane excitability. These channels are functionally regulated by GABA-B receptors. Possible physical interactions between GABA-B receptor and Kir3 channels expressed in HEK cells were evaluated using Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) experiments, co-immunoprecipitation and confocal microscopy. Our data indicate that Kir3 channels and G $\beta\gamma$ subunits can interact with the GABA-B₁ subunits independently of the GABA-B₂ subunit or Kir 3.4 which are ultimately responsible for their targeting to the cell surface. Thus signalling complexes containing GABA-B receptors, G proteins and Kir channels are formed shortly after biosynthesis most likely in the endoplasmic reticulum.

Introduction

The GABA-B receptor is a G protein-coupled receptor (GPCR) expressed predominantly in the central nervous system, notably in the cerebellum, cerebral cortex and hippocampus [1, 2]. GABA-B receptors regulate several effectors including Kir 3 inwardly rectifying K⁺ channels, voltage-gated Ca²⁺ channels and adenylyl cyclase in several different neuronal cell types. It is now well established that the functional GABA-B receptor is a heterodimer formed by GABA-B₁ and GABA-B₂ subunits [3-7]. Several other GPCRs have also been shown to form heterodimers (see [8] for review). GABA-B receptors activate homotetrameric Kir3.2 and heterotetrameric channels on the postsynaptic side of central synapses [9, 10], while to a lesser extent activating homotetrameric Kir3.4 or heterotetrameric Kir3.1/3.4 channels in specific neuronal subpopulations [11]. Kir3.2 or Kir3.4 subunits are required for cell surface targetting of Kir3.1 [12] while GABA_{B2} subunits are required for similar targetting of GABA-B₁ subunits in the heterodimer [13].

The classical understanding of GPCR activation suggests that receptor, G protein and effectors interact at the cell surface following activation of the receptor by agonist. However, this model is now challenged by many reports showing that these signalling proteins are actually part of preassembled signalling complexes even in the absence of agonist (see [14] for review). These complexes are critical to assure specificity and rapidity of signalling. However, the ontogeny of these interactions is still unclear. Whether these complexes are assembled at the cell surface or inside the cell prior to insertion in the plasma membrane remains an open question. We have recently

demonstrate that adenylyl cyclase and Kir3 channels associated with heterotrimeric G proteins and become part of receptor-sensitive signalling complexes before they reach the cell surface.⁹¹

Using confocal microscopy, co-immunoprecipitation and resonance energy transfer techniques, we examined the localization and the interaction between the receptor and the Kir 3 channels as well as with G protein subunits. We also investigate the trafficking of such complexes, using dominant-negative Rab- and Sar GTPases. Our results show that a protein complex of GABA-B receptors and Kir3 channels is formed inside the cell, although trafficking to the cell surface is regulated by different targeting events.

Materials and methods

Materials

Unless otherwise stated, all chemicals were of reagent grade and were obtained from Sigma.

Constructs

β_2 AR-GFP, β_2 AR-Luc, GFP-G γ_2 , HA-tagged Kir3.1, Gi α_1 , c-myc tagged Kir 3.2 and Flag-tagged Kir3.4 were as previously described [15, 16]. All of the tagged constructs we used have been verified to be functional ([15, 16]; Rebois et al., 2006 in press J.Cell Sci.). hGABA-B_{1A} and hGABA-B₂ in pcDNA3.1 were obtained from Perkin Elmer Biosignal (Montréal, Québec, Canada). HA-G γ_2 , Flag-G β_1 , Rab1, 2, 6 and 11 clones were obtained from the UMR cDNA Resource Center (www.cdna.org). Rab1 S25N, Rab2 S20N and Rab11 S25N were constructed using PCR as described (Dupré et al., submitted to J. Cell. Sci, details available upon request). Plasmids were also constructed that coded for the hGABA-B_{1A} with either GFP10 or *Renilla* luciferase (Luc) fused to its C-terminus. V5-hGABA-B_{1A} was constructed by inserting a V5 tag between Glycine 185 and Glutamine 186. Kir3.2-Luc was constructed in an analogous manner to Kir3.1-Luc [15]. All constructs were verified by bidirectional sequencing and shown to be active in functional assays (data not shown).

Antibodies

Rabbit anti-GABA-B₁ (C-terminal) was obtained from Santa Cruz. Guinea pig anti-GABA-B₁ (C-terminal) antibodies were from Biomol. Mouse anti-hGABA-B₂ antibodies (C-terminal) were from BD Biosciences. Mouse anti-HA and mouse anti-Myc monoclonals were from Covance and polyclonal goat anti-V5 antibodies were from

Cedarlane. Polyclonal rabbit anti-vsvg polyclonal antibody was from Bio/Can Scientific (Etobicoke, ON, Canada). Polyclonal anti-FLAG antibody and protein A-Sepharose were from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada).

Cell culture and transfection

HEK 293 cells were cultured in DMEM containing 10% FBS (Wisent, BioMedia, Medicorp) and 100 units/ml penicillin/streptomycin. Transfection of the various constructs was performed with LipofectAMINE 2000 reagent (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol. Flasks were incubated at 37 °C in a 5% CO₂ incubator. Twenty-four hours later, the media was replaced with DMEM containing 10% FBS. 48 h after transfection, cells were prepared for BRET, immunoprecipitation or for Western blotting as described below.

Immunoprecipitation

Cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) and harvested in 1 mL of RIPA buffer containing 50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.1% SDS, 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 10 µg/ml benzamidine, 5 µg/ml leupeptin and 5 µg/ml trypsin inhibitor, and solubilized with gentle shaking for 1 h at 4 °C. Supernatants were harvested after centrifugation of cell lysates at 13000 RPM for 20 min. Lysates were then precleared with 50 µl of protein A-Sepharose beads at 4°C for 30 min and clarified by centrifugation at 14000 RPM for 1 min. The pre-cleared lysate was incubated with appropriate antibody for 1 hour at 4 °C. Protein A-Sepharose was again added and shaken gently in lysis buffer containing 1% BSA for 30 min at 4 °C before use. Epitope-tagged constructs were precipitated by incubation with 100 µg of protein A-Sepharose for

2 h at 4 °C. After extensive washing with RIPA buffer, the immunoprecipitated proteins were eluted from beads with 50 µl of SDS sample buffer, resolved by SDS-PAGE, and Western blots were performed.

Western blotting

Protein samples and cell lysates (20 µL) were heated at 65 °C for 15 min and loaded into lanes of 10% SDS–polyacrylamide gels which were subsequently transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were incubated in 5% (w/v) non-fat dry milk in 25 mM Tris–HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20 (PBST) solution (pH 7.5) for 1 h at room temperature, followed by incubation with appropriate primary antibodies in PBST and 5% (w/v) non-fat dry milk at 4 °C overnight (antibody dilutions were made according to the manufacturer's recommendations). Following removal of the primary antibody, membranes were washed (3×10 min) with PBST and incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated affinity purified goat anti-rabbit/mouse/goat secondary antibody (1:20,000 dilution) in PBST containing 5% non-fat dry milk for 1 h at room temperature. Membranes were again washed (3×10 min) with PBST and immune complexes visualized by enhanced chemiluminescence (ECL, Perkin-Elmer Life Sciences).

BRET

For BRET assays, cells were grown in 6-well tissue culture plates and transiently transfected with the appropriate constructs. 48 h post-transfection, cells were washed twice in PBS, detached and resuspended in 1 mL of PBS containing 0.1% glucose (w/v) and 10^{-4} M ascorbic acid and the protease inhibitor mixture (5 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml benzamidine, 5 µg/ml soybean trypsin inhibitor). Cells were then distributed in

96-well microplates (white Optiplate; PerkinElmer Life and Analytical Sciences). Experiments were conducted using the BRET2 technology, using Coelenterazine 400a (Cedarlane) at a final concentration of 5 μ M. Signals were collected on a Fusion instrument (PerkinElmer Life and Analytical Sciences) using 410/80-nm and 515/30-nm band pass filters respectively for luciferase and GFP10 constructs. Whether or not BRET occurred was determined by calculating the ratio of the light passed by the 515/30 filter to that passed by the 410/80 filter. BRET saturation experiments were performed by increasing the concentration of cDNA for the GFP-tagged partner transfected while keeping the concentration of cDNA for the Luc-tagged partner constant. To avoid possible variations in the BRET signal resulting from fluctuation in the relative expression levels of the energy donor and acceptor, we designed transfection conditions to maintain constant GFP10/Luc expression ratios in each experimental set. Previous studies have shown that a GFP-tagged β_2 AR is both biologically active, and forms a complex that gives BRET with co-expressed β_2 AR-Luc [17] as well as with Kir3.1-Luc or AC-Luc [15]. Therefore, co-expression of β_2 AR-GFP together with β_2 AR-Rluc and hGABA-B_{1A}-GFP10 with hGABA-B₂-Luc were used as positive controls in BRET experiments. In some cases, cells were transfected with the cardiac voltage-gated K⁺ channel, KvLQT1, tagged with RLuc (KvLQT1-Luc) and β_2 AR-GFP. This combination of proteins was chosen as a negative control because KvLQT1 and β_2 AR have previously been tagged with fluorescent donor and acceptor proteins for fluorescent resonance energy transfer (FRET) experiments. Although they co-localize in cell membranes they do not normally associate, but nevertheless, at high expression levels FRET was observed in cardiomyocytes [18]. The background was the same regardless of whether we used

combinations of hGABA-B_{1A}-GFP10 and KvLQT1-Luc or β_2 AR-GFP and KvLQT1-Luc and has been subtracted to yield net BRET (i.e. negative controls have been subtracted from all BRET signals) as presented in the figures.

Confocal microscopy

24 h post-transfection, HEK293 cells were harvested and seeded on laminin-coated coverslips for 5h at 37 °C. The cells were then fixed in PBS-3% paraformaldehyde (v/v) for 20 minutes. After three washes with PBS, cells were then blocked and permeabilized for 1h with a solution containing 2% (w/v) pre-immune normal donkey and/or goat serum (Jackson Laboratories) according to secondary antibodies used and 0.2% (v/v) Triton X-100. Fixed and permeabilized cells were incubated overnight at 4 °C in a PBS solution containing 1% pre-immune normal donkey or goat serum, 0.04% Triton X-100 and appropriate antibodies. Following three washes with PBS, slides were incubated the following day in presence of donkey anti-rabbit Alexa Fluor 647, anti-guinea pig Alexa Fluor 594 and anti-mouse Alexa Fluor 488-labelled secondary antibody (all from Molecular Probes; 1:400 dilutions) for 60 minutes in the dark. The coverslips were washed three times with PBS, drained, and mounted onto glass slides using a drop of 0.4% DABCO/glycerol medium. Coverslips were fixed to the slides with nail polish. Confocal microscopy images were taken using a Zeiss LSM-510 system with a highly corrected objective (Zeiss Plan-Apochromat X63, numerical aperture 1.4 under oil immersion). Control experiments were performed in the absence of primary antibodies and revealed a low level of background staining indicating the specificity of the primary antibodies used.

Results

Trafficking of the GABA-B₁/GABA-B₂ receptor complex

Recent studies have demonstrated that the trafficking itinerary of angiotensin II AT₁ and β_2 adrenergic receptors from the ER to the Golgi is regulated by a Rab1-dependent pathway [19-21]. However, the trafficking itinerary of 7TM-Rs after ER exit remains unclear. Previous studies established exocytic pathways dependent on other Rab GTPases such as Sar 1 and Rab2 (ER-Golgi transport), Rab 6 (intra-Golgi transport), Rab8 and Rab 11 (Golgi- plasma membrane transport) as typical for a number of other proteins as well [22-26] Figure 1 illustrates the effects on GABA-B receptor trafficking of different GTPases as either wildtype (WT) or dominant negative (DN) isoforms implicated in the export of membrane protein. In the presence of each WT isoform of the different Rabs, both GABA-B₁ and GABA-B₂ subunits are trafficked to the cell surface. However, in the presence of DN isoforms of Rabs 1, 2, 6 and 11 as well as DN Sar 1, both subunits are retained in intracellular compartments. It is clear that GABA-B₁ and GABA-B₂ subunits interact initially in the ER. It is also clear from previous studies that Kir 3.1 subunits, when expressed in the absence of targetting subunits such as Kir 3.2 or Kir 3.4 are trapped in the ER [12]. We wished to determine if and where Kir 3 channels interacted with the nascent GABA-B receptor complex.

Localization and interaction of GABA-B receptors and Kir 3 channels

GABA-B₁ and Kir 3.1 colocalize to intracellular locations when expressed together in HEK293 cells in the absence of their respective targetting subunits (Figure 2A). The expression of the appropriate protein partner (GABA-B₂ or Kir3.4, respectively) results

in a disruption of this overlap to a certain extent. Figure 2B shows that the expression of Kir3.4 favours the localization of Kir3.1 to the cell surface, but leaves GABA-B₁ (and some Kir 3.1) inside the cell. In the same way, GABA-B₂ co-expression results in a shift of GABA-B₁ to the cell surface, leaving most of the Kir3.1 inside the cell (Figure 2C). When all four proteins are co-expressed, colocalization occurs predominantly at the cell surface (Figure 2D).

The colocalization of GABA-B₁ and Kir3.1 does not necessarily indicate a direct interaction between the two proteins. We have previously demonstrated direct interactions between Kir3 channels and β_2 AR as well as D2 and D4 dopamine receptors [15]. The interaction between the GABA-B₁ and the channel was examined using co-immunoprecipitation and BRET techniques (Figure 3). Figure 3A shows that GABA-B₁ is co-immunoprecipitated with HA-tagged Kir3.1 (lane 1). Co-expression of GABA-B₂, Kir3.4 alone or together reduced the observed extent of co-immunoprecipitation (lanes 2, 3 and 4). The interaction was also observed using BRET in living cells (Figure 3C) using GABA-B₁-GFP10 and Kir3.1-Luc. To determine whether BRET might occur as the result of non-specific interactions between tagged proteins, cells were transfected to co-express the cardiac voltage-gated K⁺ channel, KvLQT1, tagged with luciferase (KvLQT1-Luc) and β_2 AR-GFP or GABA-B₁-GFP10. BRET between these GABA-B₁-GFP10 and Kir3.1-Luc was significantly higher (even though the magnitude of these BRET signals was low) than that seen between GABA-B₁-GFP10 and KvLQT1-Luc. BRET depends on both the distance and orientation of the donor and acceptor molecules and may vary depending on the particular pair being studied. To determine whether or not interactions

as measured by BRET are specific, two types of experiments should be performed. The interaction must 1) be competed by untagged versions of the partners and 2) saturable in the sense that increasing the amount of the acceptor (GFP-tagged partner) will eventually result in transfer of all available energy from the donor (Luciferase-tagged partner). First, the BRET signal is diminished when increasing amounts of a cold competitor, untagged Kir3.4 (which, because it can form homotetrameric Kir3 channels presumably can interact with GABA-B receptors) is co-expressed (Figure 3C). Curiously, GABA-B₂ overexpression did not alter the interaction between GABA-B₁-GFP10 and Kir3.1-Luc suggesting that they still interact regardless of the localization of GABA-B₁. These data also suggest that Kir3.4 can interact with the GABA-B₁ receptor as it does with β_2 AR as well as D2 and D4 dopamine receptors. The lack of competition by GABA-B₂ may indicate that the channel does not interact with the GABA-B₂ *per se*. As shown in Figure 3D, net BRET between GABA-B₁-GFP10 and Kir3.1-Luc saturates as the amount of acceptor is increased. Taken together, our data indicate that GABA-B₁ and Kir3.1 interact in a direct and specific manner.

The competition experiments described above and our previous work [15] indicate that other Kir3 channel subunits may interact with the GABA-B₁ receptor. We used a similar approach to demonstrate an interaction between the receptor and the Kir3.2 channel subunit. Figure 4 illustrates the localization of GABA-B₁ and Kir3.2. Kir3.2, unlike Kir3.1, is able to form homotetramers that can target to the cell surface [12]. When GABA-B₁ and Kir3.2 were co-expressed, very little overlap was observed in confocal images. But when GABA-B₂ is present, perfect colocalization of the two proteins was

observed. We again assessed the interaction between the two partners by co-immunoprecipitation and BRET. Figure 5A shows that immunoprecipitation of myc-tagged Kir3.2 revealed the presence of GABA-B₁ only in the presence of GABA-B₂ (lane 1). However, BRET experiments (Figure 5C) indicated that Kir3.2 and GABA-B₁ interact in both the presence and absence of GABA-B₂. This may indicate that the interaction is stabilized by the presence of GABA-B₂ and in its absence does not survive the conditions required for solubilization and co-immunoprecipitation. No interaction between Kir3.2 and KvLQT1 was detected using either co-immunoprecipitation (Figure 5B) or BRET (i.e. no BRET signals were detected above the GABA-B₁-GFP10/KvLQT1-Luc or β_2 AR-GFP/KvLQT1-Luc background).

Co-localization and interaction of the GABA_B with G protein subunits

Figure 6 shows the localization of different G protein subunits when co-expressed with GABA-B₁ (with or without GABA-B₂). G β and G γ subunits are assembled together shortly after their biosynthesis and inserted in the ER [27]. Confocal images demonstrate that in the absence of stoichiometric amounts of the G α_i subunit, G $\beta_1\gamma_2$ subunits have a wide distribution both inside the cell and at the cell surface. Correct targeting of G $\beta\gamma$ to cell membrane requires G α_i (Figure 6, right panel, see also [27, 28]). GABA-B₁ subunits colocalize with G $\beta_1\gamma_2$ inside the cell and co-expression of GABA-B₂ permits a further colocalization of GABA-B₁ with with G $\beta_1\gamma_2$ and G α_i at the cell surface.

As for the GABA-B₁/Kir3.1 complex, interaction between GABA-B₁ and the G $\beta_1\gamma_2$ heterodimer was examined using co-immunoprecipitation and BRET. Figure 7 shows co-

immunoprecipitation and significant BRET between GABA-B₁ and Gβγ was observed when they were co-expressed together. This interaction was first examined by co-immunoprecipitation of V5-tagged GABA-B₁ and FLAG-tagged Gβ₁ (Figure 7A,B). GABA-B₁ receptors did not co-immunoprecipitate KvLQT1 (Figure 7C). BRET signals were detected between GFP-Gγ₂ and GABA-B₁-Luc (Figure 7D). Expression of the other members of the heterotrimeric G protein or of the GABA-B₂ subunit did not alter the interaction in any significant manner. A BRET saturation experiment between GABA-B₁-LUC and GFP-Gγ₂ again confirmed the specificity of the interaction observed (Figure 7E). Taken together, our results indicate that GABA-B₁ receptors interact with both their G protein and effector partners before they transit to the cell surface.

Discussion

The results shown in this report suggest that GABA-B₁ receptor, like many other GPCRs, is part of a stable protein complex with its cognate G protein and effector partners [15, 29]. Being part of such a complex is critical to ensure both specific and rapid signalling. Figures 2 and 3 suggest that the interaction between the receptor and the effector is constitutive and does not require receptor activation. Moreover, they interact before cell surface targeting. Considering the fact that GABA-B₁ has a carboxy-terminal ER retention sequence [13] and the Kir3.1 subunit lacks a forward ER trafficking signal [30], it is highly probable that the interaction observed between the two (Fig. 2) occurs in the ER or ER/Golgi complex. When GABA-B₂ is present, GABA-B₁ is targeted predominantly to the cell surface. Similarly, Kir3.2 and Kir3.4 can target Kir3.1 to the cell surface [30]. Both BRET and co-immunoprecipitation experiments indicated that the receptor/Kir3.1 channel complex was stable, independent of subcellular localization. Thus, there appear to be two independent targeting signals required for surface localization of the Kir3.1/ GABA-B₁ complex. Kir3.2, which like Kir3.4 can be targeted independently to the plasma membrane also interacts with GABA-B₁ (Figure 3) and indeed a portion of the Kir3.2 channels become retained intracellularly in the absence of GABA-B₂. Although the presence of GABA-B₂ does not affect the BRET signal between Kir3.2 and GABA-B₁, it is clear that the complex is more stable to detergent solubilization in the presence of GABA-B₂. Not surprisingly, it is the heterodimeric GABA-B receptor which has been shown to regulate Kir3 channels [3-7]. We have also demonstrated that Rab and Sar1 GTPases, critical for regulating outward protein trafficking, may also provide key checkpoints for the assembly of GABA-B-based

receptor complexes (Figure 1). We demonstrate that the trafficking of the GABA-B₁/B₂ complex requires several different Rab/Sar1-dependent steps. Some of these steps may actually be redundant. For example, both Rab 1 and Rab 2 have an effect on the membrane localization of the GABA-B₁/B₂ complex and both serve in ER to *cis*-golgi transport [31, 32]. Therefore, it is highly probable that the GABA-B₁/B₂ complex may differentially be shunted to different specific subcellular compartments on its way to the surface depending on what other partners it may be required to associate with in a given cellular context. It is clear that multiple checkpoints control the assembly and trafficking of GABA-B receptors and their associated signalling machinery.

A signalling protein complex such as the one described here would not presumably be functional without the presence of a heterotrimeric G protein. We have recently demonstrated that β_2 AR-sensitive interactions between Kir3.1 and G protein heterotrimers can occur when the complex is in the ER (Rebois et al., 2006, in press J. Cell Sci.). Therefore, we assessed the presence of G $\beta\gamma$ dimer in GABA-B₁/Kir3 complexes as well. We detected co-localization of GABA-B₁ and G $\beta\gamma$ in the absence or presence of GABA-B₂ and stoichiometrically expressed G α_i . However, the presence of G α_i and GABA-B₂ favoured the localization of the GABA-B₁/G $\beta\gamma$ /Kir 3.1 complex at the cell surface. It has been previously demonstrated that heterotrimer formation assures correct trafficking of G proteins to the cell surface [27, 28]. In addition to colocalization of these signalling molecules, we demonstrate using co-immunoprecipitation and BRET that they are assembled into larger signalling complexes. We would suggest that

formation of receptor-based signalling complexes is also critical for assuring the specificity of cellular signalling.

Despite showing early interactions between members of GABAergic signalling complexes, several questions remain. How are constitutive interactions modulated by the addition of agonist? Are there multiple sites of interaction in the complex for any one of the individual components? For example, it is known that G $\beta\gamma$ subunits interact with G α subunits, Kir 3 channels and as we have demonstrated, with GABA-B receptors. These interactions occur during transport to the cell surface. However, it is not known how the individual interactions between partners in a metastable complex may be altered by subsequent agonist stimulation at the cell surface. Are the sites of agonist-mediated interactions different from those involved in forming the constitutive, trafficking-based interfaces? Given that a single tetrameric Kir 3 channels has between 8 and 12 G $\beta\gamma$ binding sites [33-35], these complexes may have a great deal of conformational flexibility despite remaining intact as a complex. Similar considerations apply to the sites of receptor/effector or receptor/G protein interactions. Also, the trafficking itinerary of the receptor-based subcomplexes should be explored, depending on 1) direction, i.e. anterograde or retrograde, 2) nature of the specific effector pathways being considered and 3) cell type or subcellular compartment. It is known the GABA-B receptors can couple to a number of distinct signalling pathways and physically interact with a large number of signalling molecules and scaffolding proteins. We would suggest that the trafficking itinerary and the constituents of individual signalling complexes may exert mutual regulatory effects over one another.

Figures

Figure 1

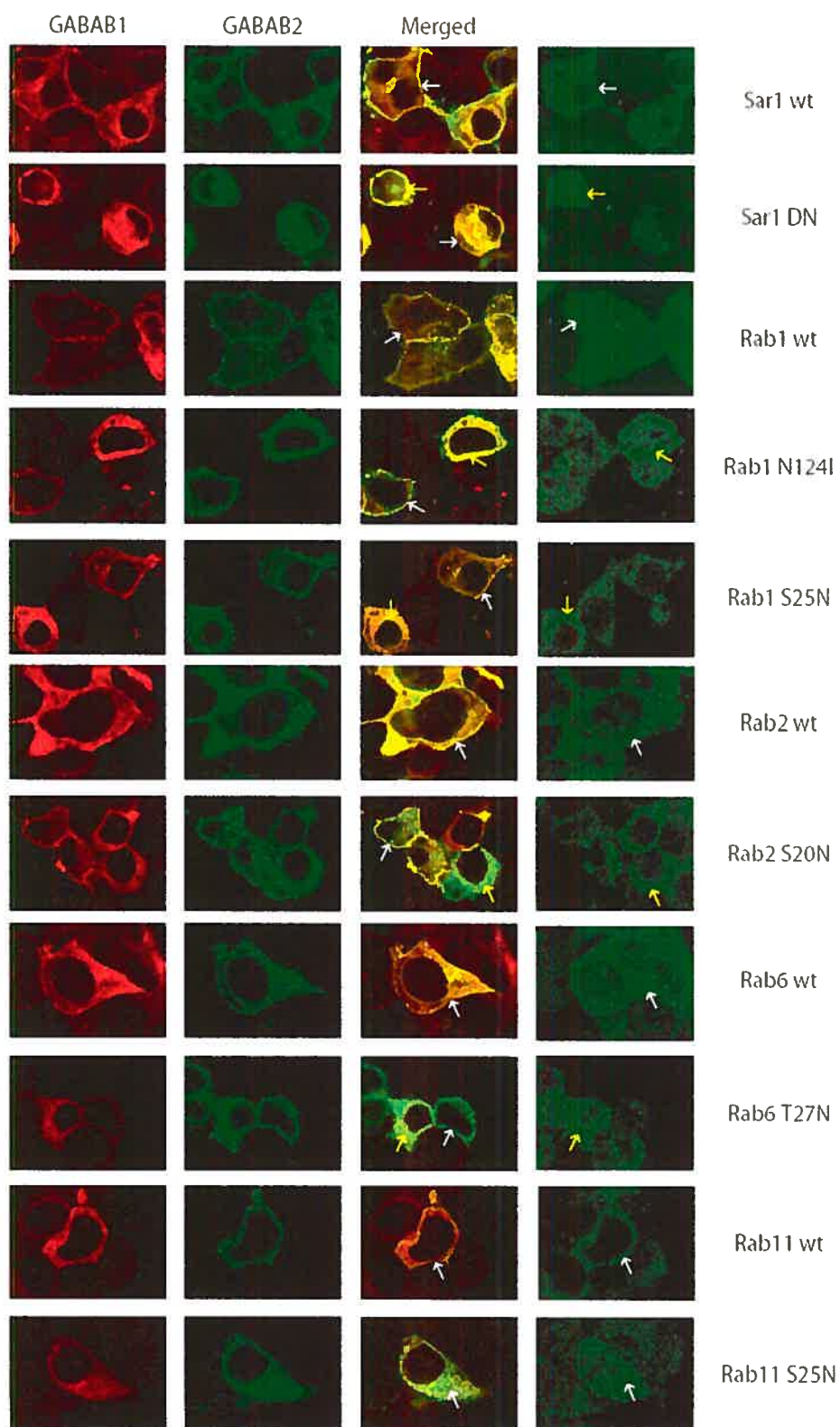


Figure 2

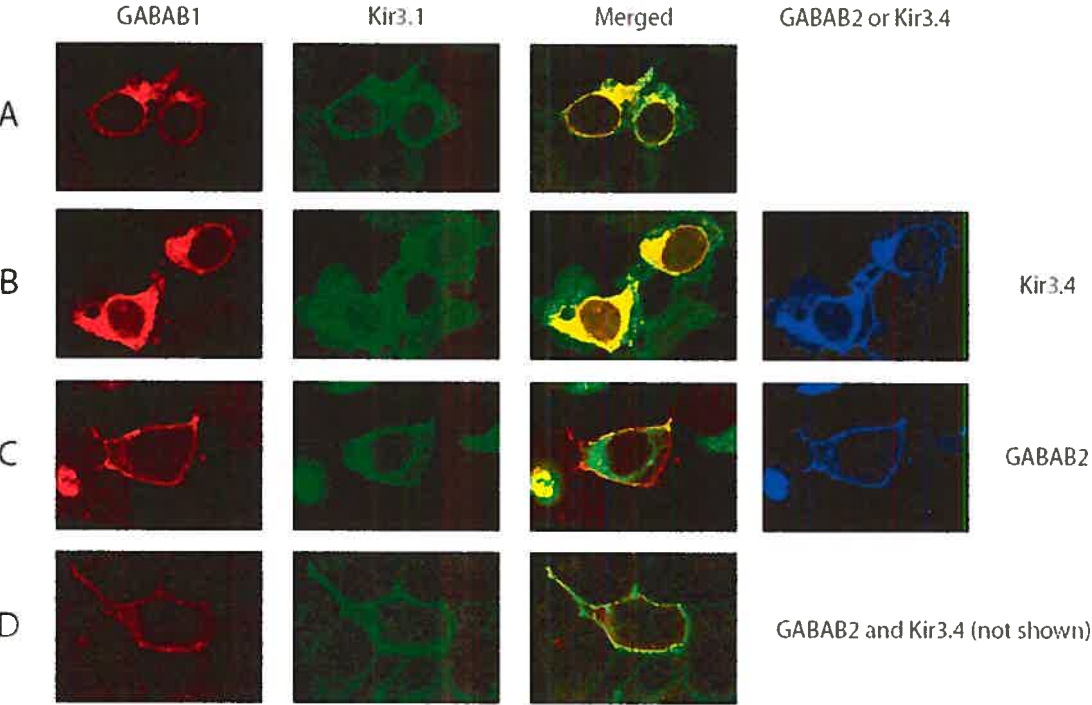


Figure 3

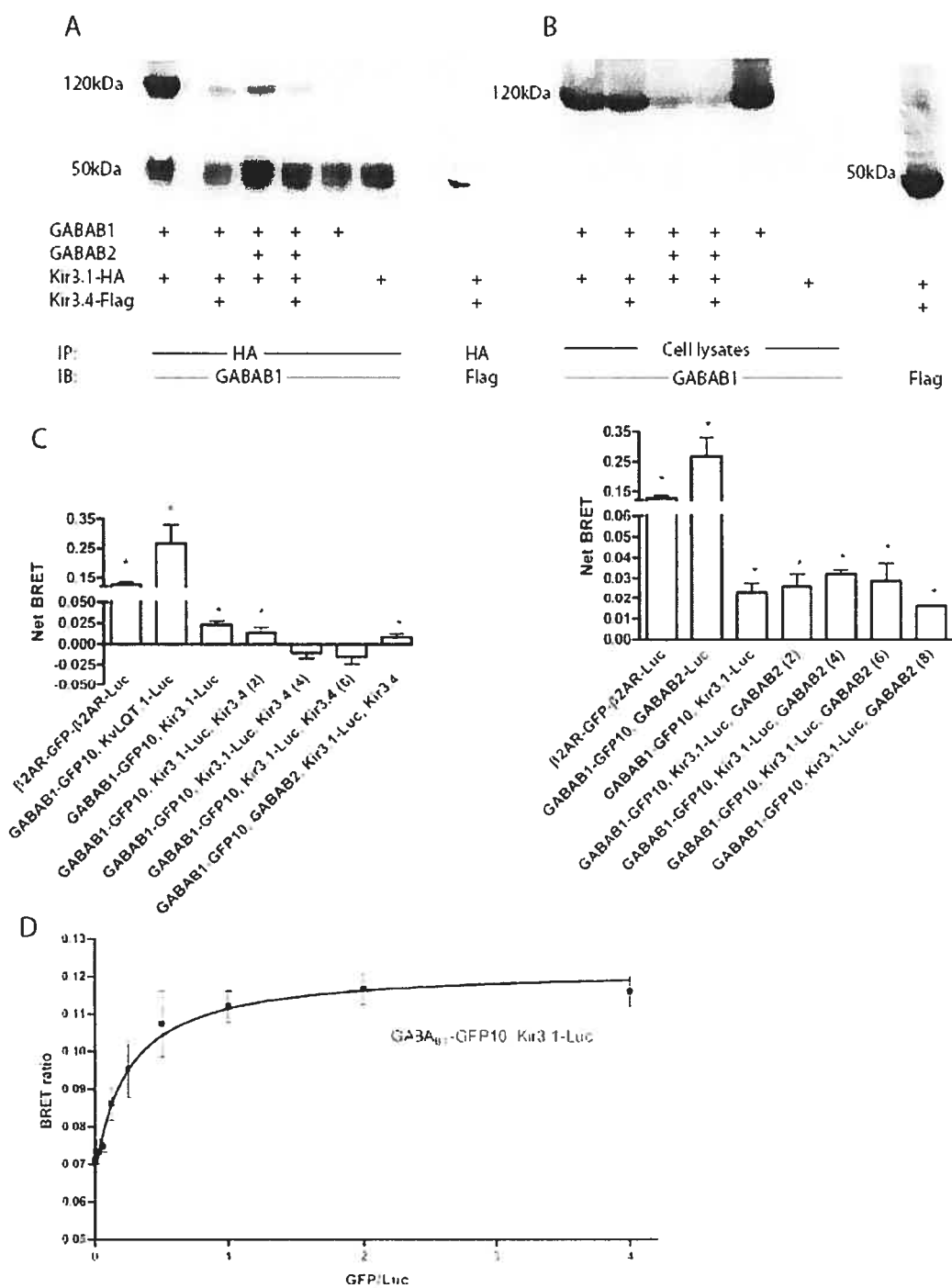


Figure 4

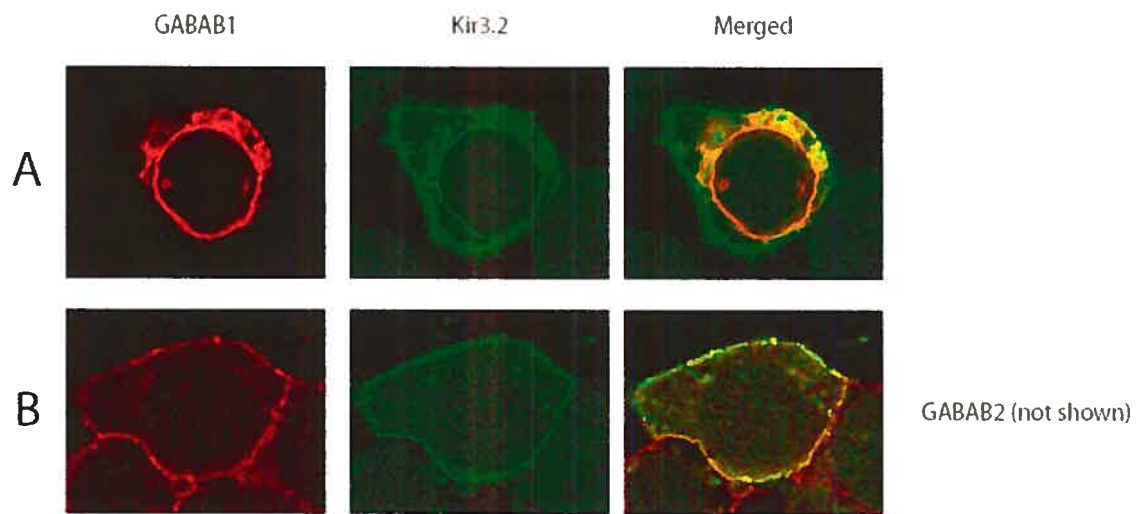


Figure 5

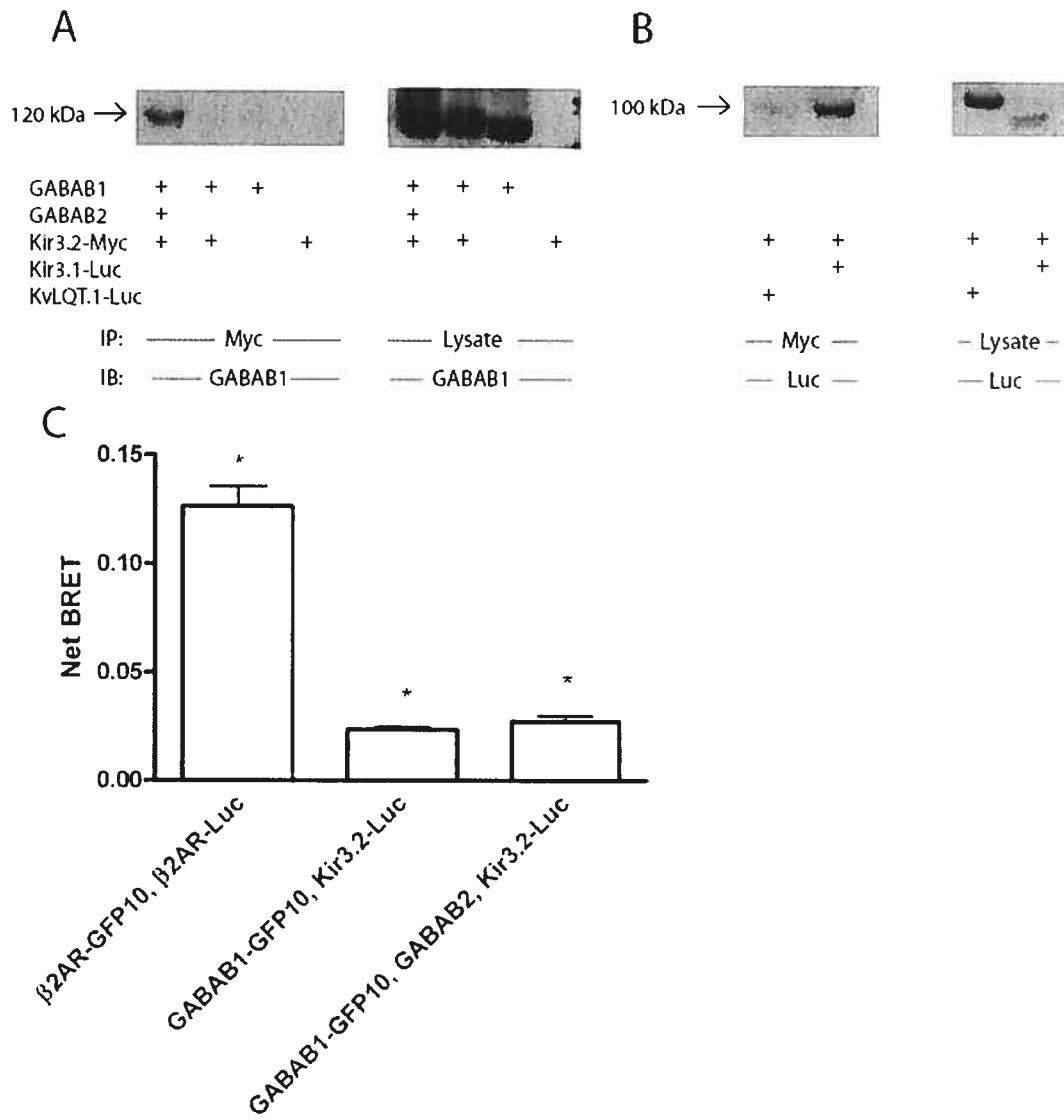


Figure 6

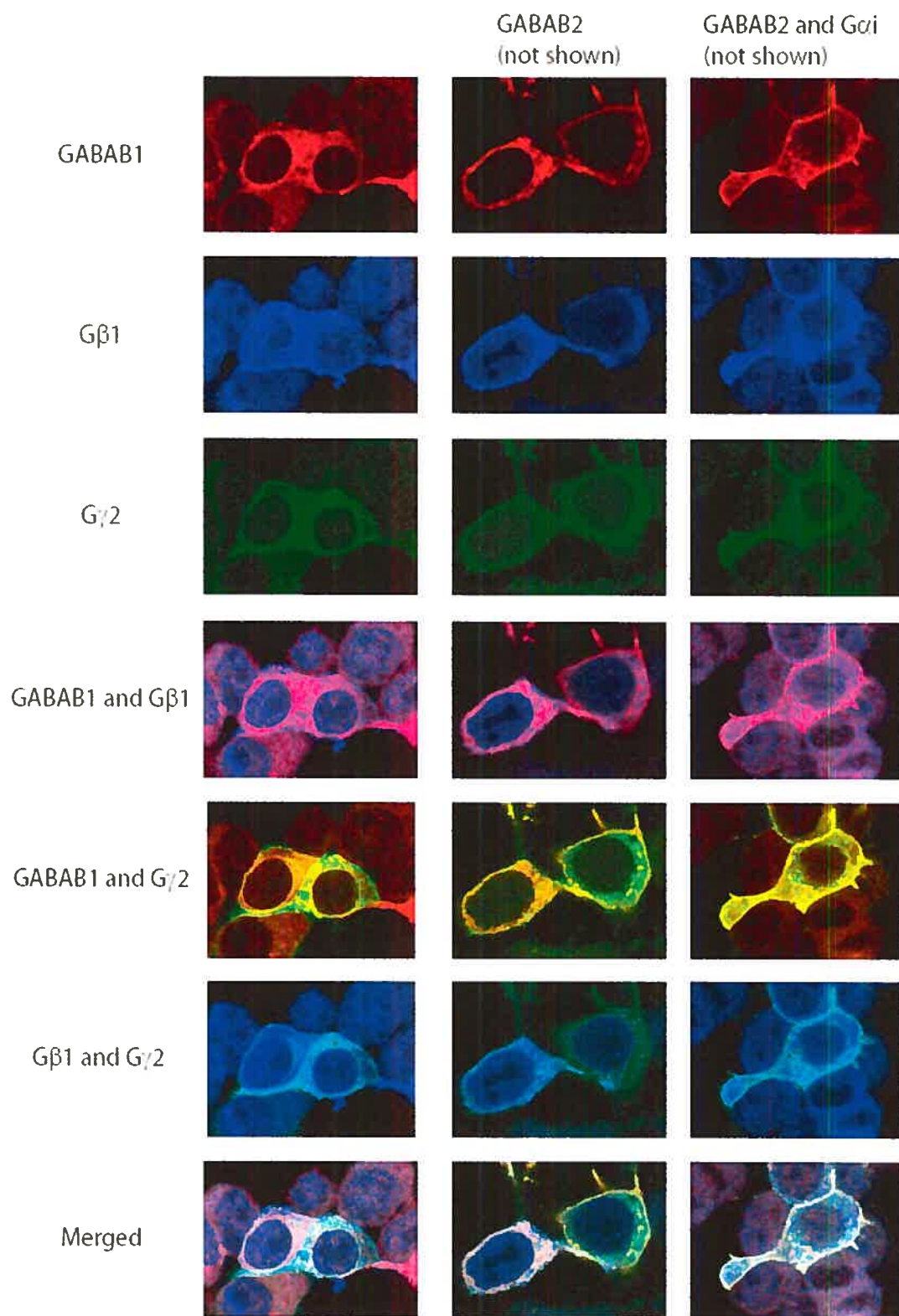


Figure 7

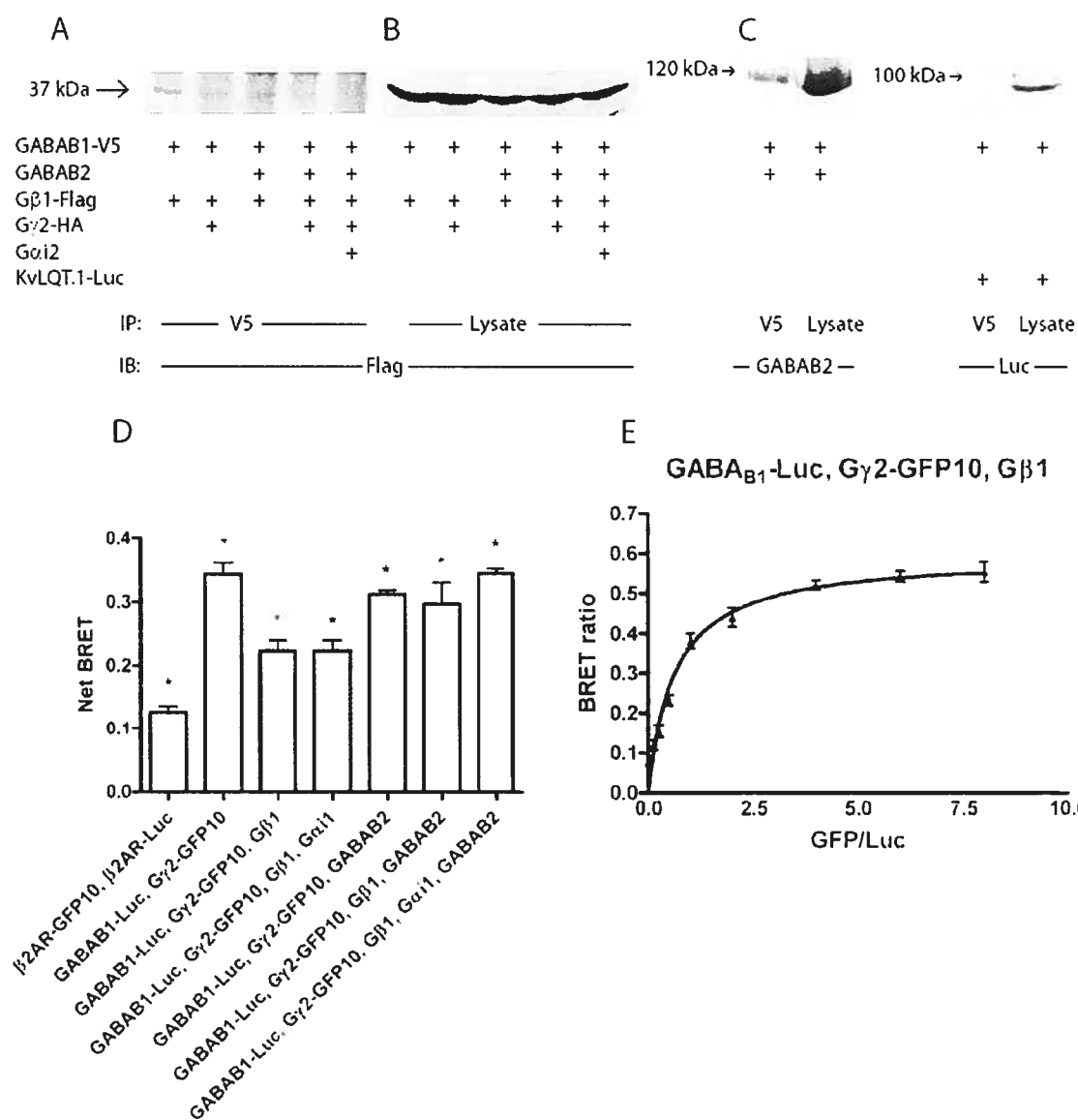


Figure legends

Figure 1: Trafficking itinerary of GABA_{B1/B2} receptor. Trafficking of GABA-B₁/GABA-B₂ receptor complex in the presence of WT or DN Rab1, Rab2, Rab6, Rab11 and Sar1 GTPases. Left column, GABA-B₁, middle columns, GABA-B₂, and GABA-B_{1/2} merged images, right column, tagged GTPase construct. Triple labelling was performed using guinea pig anti-GABA-B₁, mouse anti-GABA-B₂ and rabbit anti-Flag, anti-c-myc or anti-vsvg antibodies (depending on the Rab or Sar1 construct). Arrows highlight two cells (specifically for the Rab S25N and Sar T39N constructs) which expressed the receptor and the indicated Rab construct (yellow) or not (white showing localization at the plasma membrane). These images are representative of three individual experiments.

Figure 2: Colocalization of GABA_{B1} and Kir3.1 in the presence or absence of surface-targetting subunits. *A* Both GABA-B₁ and HA-tagged Kir3.1 co-localize inside the cell when expressed together. *B* Expression of Flag-tagged Kir3.4 alters the localization of Kir3.1-Luc to the cell surface but not GABA-B₁. Rightmost panel shows expression of Kir 3.4. *C* Expression of GABA-B₂ alters the localization of GABA-B₁ but not HA-tagged Kir3.1. Rightmost panel shows expression of GABA-B₂. *D* Expression of both GABA-B₂ and Flag-tagged Kir3.4 alters the localization of their cognate partners. Triple labelling was performed using guinea pig anti-GABA-B₁, mouse anti-luciferase or mouse anti-GABA-B₂ or anti-HA and rabbit anti-Flag antibodies. These images are representative of three individual experiments.

Figure 3: Interaction between GABA_{B1} and Kir3.1. *A* Immunoprecipitation of HA-tagged Kir3.1 reveals the presence of GABA-B₁ when co-expressed together (lane 1). Co-expression of Kir3.4, GABA-B₂ or both alters the efficiency of the co-immunoprecipitation but the interaction is preserved (lanes 2, 3 and 4). Rightmost separate lane is a positive control showing that immunoprecipitation of HA-tagged Kir3.1 can co-immunoprecipitate Flag-tagged Kir3.4. Here, the 50 kDa band represents the IgG heavy chain. *B* Cell lysates of the various conditions in part A demonstrating similar levels of GABA-B₁ and Kir 3.1 expression (rightmost lane). Figure is representative of three independent experiments. *C* Net BRET between GABA-B₁-GFP10 and Kir3.1-Luc was calculated as described in *Materials and Methods*. Co-expression of GABA-B₂ (left panel) does not compete for the interaction while co-expression of Kir 3.4 (right panel) resulted in reduced BRET signals. *D* BRET saturation curve of the interaction between Kir3.1-Luc and GABA-B₁-GFP10 indicates specificity. Data in parts C and D are expressed as mean \pm s.e.m. of at least 3 different experiments. * indicates $p < 0.05$ compared with controls using a one-tailed Student's *t*-test.

Figure 4: Colocalization of GABA-B₁ and Kir3.2: *A* GABA-B₁ and c-myc-tagged Kir3.2 are co-localized inside the cell even if Kir3.2 is mostly at the cell surface. *B* Expression of GABA-B₂ alters the localization of GABA-B₁, leaving almost no Kir3.2 inside the cell. These images are representative of three individual experiments. It was not possible to perform a triple labelling with GABA-B₂ with the antibodies we have on hand for part B.

Figure 5: Interaction between GABA-B₁ and Kir3.2: *A* Right Panel: Immunoprecipitation of myc-tagged Kir3.2 reveals the presence of GABA-B₁ when co-expressed together with GABA-B₂. Left panel: Cell lysates of each condition shown in Part A. *B* Co-immunoprecipitation controls showing association between c-myc-tagged Kir3.2 and Kir3.1-Luc but not with KvLQT1-Luc. These images are representative of three individual experiments. *C* Net BRET ratios measured between GABA-B₁-GFP10 and Kir3.2-Luc were calculated as described in *Materials and Methods*. Data in part C is expressed as mean \pm s.e.m. of at least 3 different experiments. * indicates $p < 0.05$ compared with negative controls using a one-tailed Student's *t*-test.

Figure 6: Co-localization of the receptor and heterotrimeric G protein subunits.

Left panel GABA-B₁, Flag-tagged G β_1 and HA-tagged G γ_2 co-localize inside the cell when expressed together. *Middle Panel* Expression of GABA-B₂ alters the localization of GABA-B₁ to the cell surface but not G $\beta\gamma$. *Right panel* Expression of GABA-B₂ and G α_i alters the localization of G $\beta\gamma$ and GABA-B₁. Top three panels shows the expression of individual proteins while the next three panels merge each of the pairs individually. The lowermost panel represents a merged image of the GABA-B₁, Flag-tagged G β_1 and HA-tagged G γ_2 . Triple labelling was performed using guinea pig anti-GABA-B₁, mouse anti-HA and rabbit anti-Flag antibodies. Labelling of G α_i and GABA-B₂ are not shown. These images are representative of three individual experiments.

Figure 7: Interaction of GABA-B₁ with G $\beta\gamma$ subunits. *A* Immunoprecipitation of GABA-B₁-V5 reveals the presence of G β_1 -Flag when expressed together (lane 1).

Supplemental co-expression of $G\gamma_2$ -HA, $G\alpha 1$ and GABA- B_2 alters the efficiency of the interaction (lane 2, 3, 4 and 5). *B* Cell lysates of each conditions. *C* Positive and negative controls of the immunoprecipitation performed. These images are representative of three individual experiments. *D* Net BRET ratio between GABA- B_1 -GFP10 and Luc- $G\beta_1$ was calculated as described in *Materials and Methods*. Expression of $G\gamma_2$ -HA is lowering the signal. *E* BRET saturation curve of the interaction measured between GABA $_{B1}$ -Luc and GFP- $G\gamma_2$ with co-transfected $G\beta_1$ -Flag. Data in parts D and E are expressed as mean \pm s.e.m. of at least 3 different experiments. * indicates $p < 0.05$ compared with controls using a one-tailed Student's *t*-test.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research and Heart and Stroke Foundation of Quebec to T.E.H. T.E.H. holds a senior scholarship from the Fond de Recherche en Santé du Québec. The vsvg-Sar1 WT, vsvg-Sar1 H79G and vsvg-Sar1 T39N were from Dr. Phil Wedegaertner (Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA); Flag-Rab1 N124I from Dr. Guangyu Wu (Louisiana State University Health Sciences Center, New Orleans, LA; CD4-Rluc from Dr. Jana Stanková (Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada); $G\alpha_{i1}$ -Rluc, $G\alpha_{i1}$ -GFP₁₀, $G\alpha_s$ -GFP₁₀, $G\gamma_2$ -Rluc, $G\gamma_2$ -GFP₁₀, and $G\beta_1$ -GFP₁₀ were obtained from Dr. Céline Galès and Dr. Michel Bouvier (Université de Montréal, Montréal, Canada). We thank Victor Rebois and Céline Galès for helpful discussion.

References

- [1] Clark JA, Mezey E, Lam AS, Bonner TI. Brain Res 2000;860(1-2):41-52.
- [2] Mohler H, Benke D, Fritschy JM. Life Sci 2001;68(19-20):2297-2300.
- [3] Kuner R, Kohr G, Grunewald S, Eisenhardt G, Bach A, Kornau HC. Science 1999;283(5398):74-77.
- [4] Kaupmann K, Malitschek B, Schuler V, Heid J, Froestl W, Beck P, Mosbacher J, Bischoff S, Kulik A, Shigemoto R, Karschin A, Bettler B. Nature 1998;396(6712):683-687.
- [5] Jones KA, Borowsky B, Tamm JA, Craig DA, Durkin MM, Dai M, Yao WJ, Johnson M, Gunwaldsen C, Huang LY, Tang C, Shen Q, Salon JA, Morse K, Laz T, Smith KE, Nagarathnam D, Noble SA, Branchek TA, Gerald C. Nature 1998;396(6712):674-679.
- [6] Ng GY, Clark J, Coulombe N, Ethier N, Hebert TE, Sullivan R, Kargman S, Chateaufneuf A, Tsukamoto N, McDonald T, Whiting P, Mezey E, Johnson MP, Liu Q, Kolakowski LF, Jr., Evans JF, Bonner TI, O'Neill GP. J Biol Chem 1999;274(12):7607-7610.
- [7] White JH, Wise A, Main MJ, Green A, Fraser NJ, Disney GH, Barnes AA, Emson P, Foord SM, Marshall FH. Nature 1998;396(6712):679-682.
- [8] Bulenger S, Marullo S, Bouvier M. Trends Pharmacol Sci 2005;26(3):131-137.
- [9] Koyrakh L, Lujan R, Colon J, Karschin C, Kurachi Y, Karschin A, Wickman K. J Neurosci 2005;25(49):11468-11478.
- [10] Luscher C, Jan LY, Stoffel M, Malenka RC, Nicoll RA. Neuron 1997;19(3):687-695.
- [11] Wickman K, Karschin C, Karschin A, Picciotto MR, Clapham DE. J Neurosci 2000;20(15):5608-5615.
- [12] Ma D, Zerangue N, Raab-Graham K, Fried SR, Jan YN, Jan LY. Neuron 2002;33(5):715-729.
- [13] Margeta-Mitrovic M, Jan YN, Jan LY. Neuron 2000;27(1):97-106.
- [14] Rebois RV, Hebert TE. Receptors Channels 2003;9(3):169-194.

- [15] Lavine N, Ethier N, Oak JN, Pei L, Liu F, Trieu P, Rebois RV, Bouvier M, Hébert TE, Van Tol HHM. *The Journal of Biological Chemistry* 2002;277(48):46010-46019.
- [16] Gales C, Rebois RV, Hogue M, Trieu P, Breit A, Hebert TE, Bouvier M. *Nat Methods* 2005;2(3):177-184.
- [17] Angers S, Salahpour A, Joly E, Hilairet S, Chelsky D, Dennis M, Bouvier M. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(7):3684-3689.
- [18] Dilly KW, Kurokawa J, Terrenoire C, Reiken S, Lederer WJ, Marks AR, Kass RS. *J Biol Chem* 2004;279(39):40778-40787.
- [19] Filipeanu CM, Zhou F, Claycomb WC, Wu G. *J Biol Chem* 2004.
- [20] Wu G, Zhao G, He Y. *J Biol Chem* 2003;278(47):47062-47069.
- [21] Duvernay MT, Filipeanu CM, Wu G. *Cell Signal* 2005;17(12):1457-1465.
- [22] Rosenfeld JL, Knoll BJ, Moore RH. *Receptors Channels* 2002;8(2):87-97.
- [23] Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. *Physiol Rev* 2001;81(1):153-208.
- [24] Huber LA, Pimplikar S, Parton RG, Virta H, Zerial M, Simons K. *J Cell Biol* 1993;123(1):35-45.
- [25] Martinez O, Schmidt A, Salamero J, Hoflack B, Roa M, Goud B. *J Cell Biol* 1994;127(6 Pt 1):1575-1588.
- [26] Urbe S, Huber LA, Zerial M, Tooze SA, Parton RG. *FEBS Lett* 1993;334(2):175-182.
- [27] Takida S, Wedegaertner PB. *J Biol Chem* 2003;278(19):17284-17290.
- [28] Takida S, Wedegaertner PB. *FEBS Lett* 2004;567(2-3):209-213.
- [29] Davare MA, Avdonin V, Hall DD, Peden EM, Burette A, Weinberg RJ, Horne MC, Hoshi T, Hell JW. *Science* 2001;293(5527):98-101.
- [30] Ma D, Zerangue N, Lin YF, Collins A, Yu M, Jan YN, Jan LY. *Science* 2001;291(5502):316-319.
- [31] Segev N. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13(4):500-511.
- [32] Olkkonen VM, Stenmark H. *Int Rev Cytol* 1997;176:1-85.

- [33] Huang CL, Jan YN, Jan LY. FEBS Lett 1997;405(3):291-298.
- [34] Huang CL, Slesinger PA, Casey PJ, Jan YN, Jan LY. Neuron 1995;15(5):1133-1143.
- [35] Clancy SM, Fowler CE, Finley M, Suen KF, Arrabit C, Berton F, Kosaza T, Casey PJ, Slesinger PA. Mol Cell Neurosci 2005;28(2):375-389.

CHAPITRE 3. RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

3.1 Résultats supplémentaires

Les résultats supplémentaires présentés ici proviennent d'expériences qui ont été fait en parallèle au projet principal. Tout d'abord, les premiers résultats montrés ici démontrent l'existence d'un homodimère GABA_{B1} dont le rôle reste à définir. L'abondance relative de GABA_{B1} par rapport à GABA_{B2} soulevait l'hypothèse que GABA_{B1} pouvait avoir un rôle en tant que récepteur seul, ou encore en tant qu'homodimère. Aussi, en cherchant des protéines qui pouvaient potentiellement interagir avec le récepteur GABA et influencer et altérer son rôle ou sa localisation, la spinophiline s'est imposée d'elle-même étant donné sa localisation cellulaire et sa capacité de lier une domaine PDZ. L'interaction *in vitro* entre la spinophiline et la queue C-terminale de GABA_{B1} est donc montrée ici, en plus de la colocalisation des deux protéines.

3.1.1 Existence d'un homodimère GABA_{B1}

Comme mentionné plus haut, l'abondance de GABA_{B1} comparativement à GABA_{B2} porte à croire qu'il pourrait exister un rôle pour GABA_{B1} seul ou en homodimère à l'intérieur de la cellule. Des expériences de co-immunoprécipitation et de BRET viennent confirmer l'existence de l'homodimère dans des conditions *in vivo*. Les matériels et la méthodologie sont les mêmes que ceux utilisés dans l'article. Deux anticorps supplémentaires ont été utilisés contre le GFP, un monoclonal et un polyclonal, provenant tout les deux de BD Biosciences.

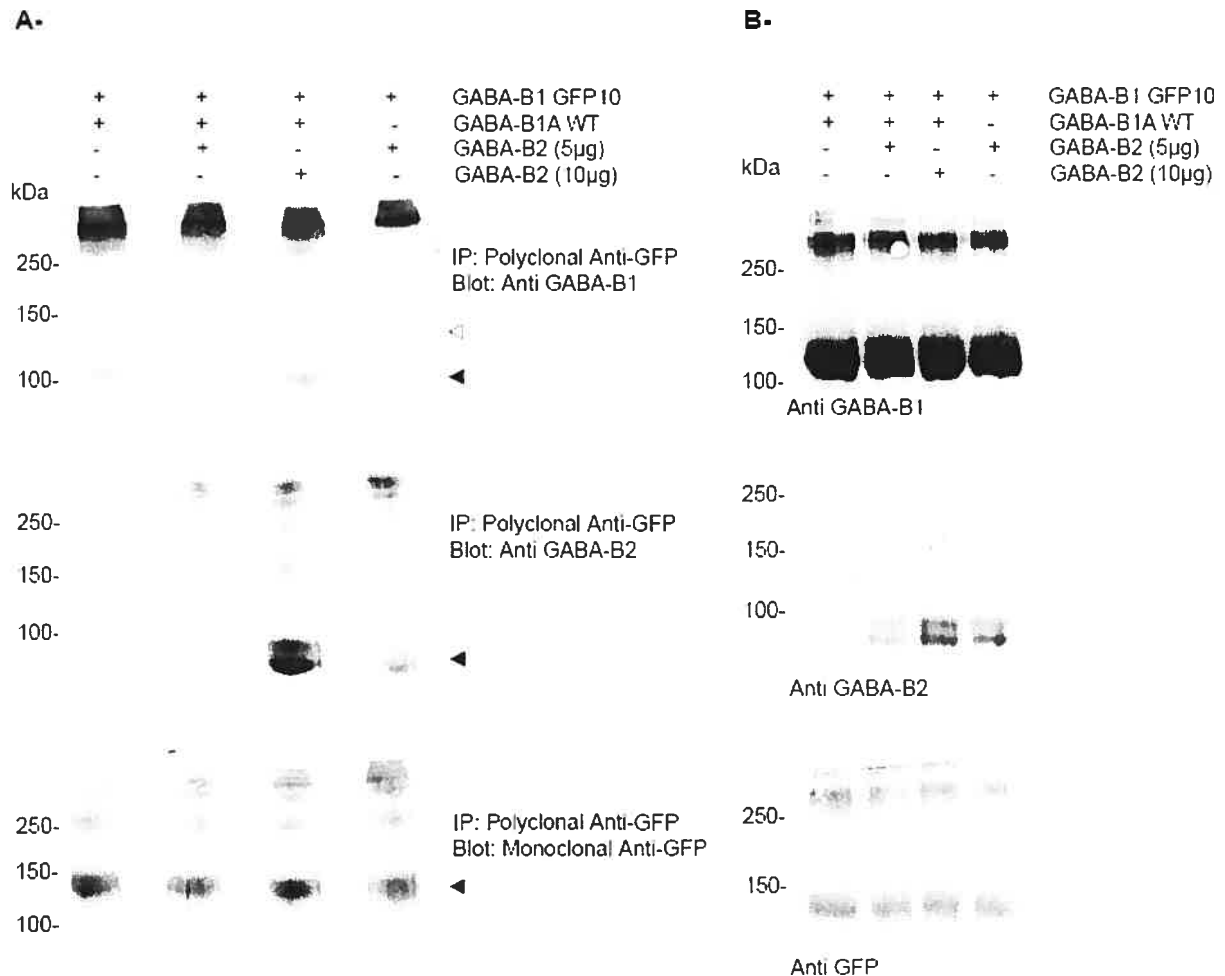


Figure 7 : *GABA-B1A* receptors can form homomultimers. A) Co-immunoprecipitation of HEK293 cells transfected with hGABA-B1A-GFP, wild-type hGABA-B1A, and wild-type hGABA-B2. Following immunoprecipitation with polyclonal anti-GFP, eluates were blotted onto membranes and probed with anti-GABA-B1 (upper panel) or anti GABA-B2 (middle panel). The membrane probed with GABAB2 was subsequently stripped in NaOH for 15min and reprobed with monoclonal anti-GFP (lower panel) in order to confirm the effectiveness of the immunoprecipitation procedure. Dark arrowheads indicate GABA-B1 wild type (upper panel), GABAB2 (middle panel) and GABA-B1-GFP (lower panel). A faint signal was also detected for GABA-B1A-GFP when probed with anti-GABA-B1 (open arrowhead in upper panel). B)

Western blot of whole cell lysates showing the similar expression levels of the different transfected constructs (upper panel, GABAB1 wild type; middle panel GABA-B2; lower panel, GABA-B1-GFP. Note that wild-type hGABA-B1A was overshadowed by GABA-B1-GFP in lane 4 of the upper panel.

Ces expériences ont été réalisées par Maxime Richer.

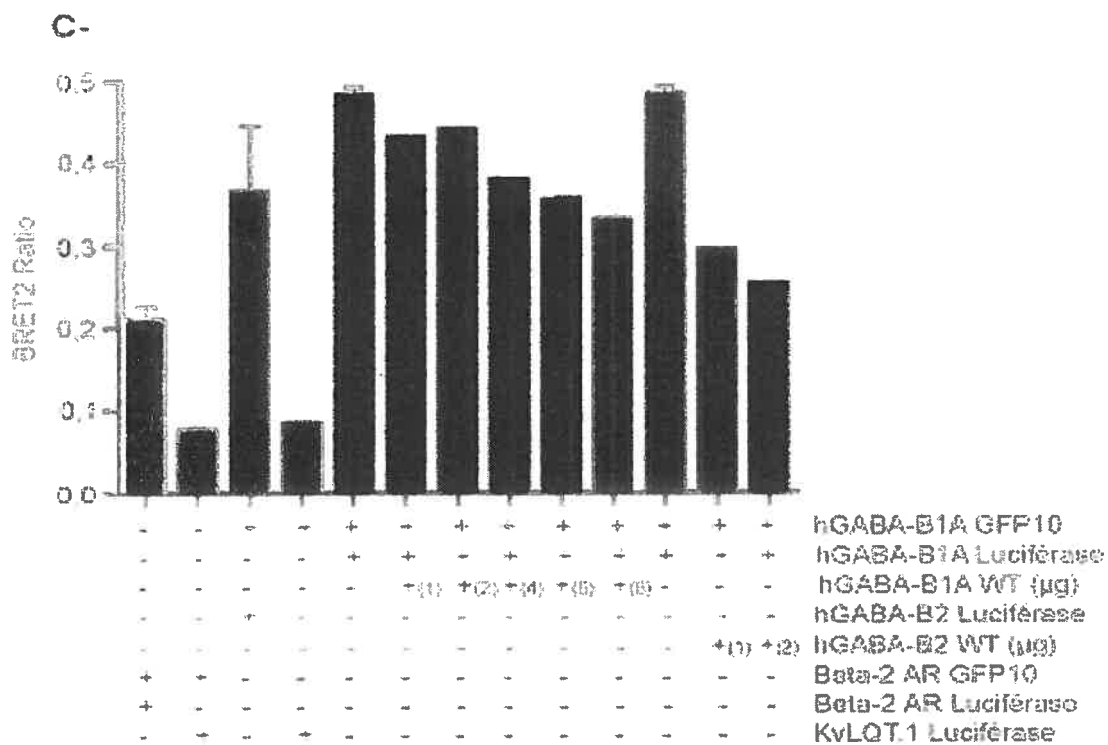


Figure 8 : Le récepteur GABA_{B1} peut former un homodimère (2). Ratio de BRET entre GABA_{B1}-GFP10/GABA_{B1}-Luc co-transfectés avec différentes quantités de GABAB2 de type sauvage

3.1.2 Interaction *in vitro* de la spinophiline avec GABA_{B1}

L'article ici présent démontre l'existence d'un complexe protéique qui contient plusieurs membres importants de la signalisation cellulaire associée aux RCPG. Cependant, d'autres protéines peuvent être présentes dans un tel complexe de signalisation. La présence d'un domaine de liaison PDZ sur spinophiline en plus de sa présence dans les dendrites en font une candidate idéale pour être la protéine d'échafaudage qui serait présente dans un complexe GABAergique. En utilisant la technique de GST pulldown, il a été possible de montrer une interaction *in vitro* entre la queue C-terminale du récepteur GABA_{B1} et la protéine d'échafaudage spinophiline. Cette interaction semble se faire via le motif de liaison pour les protéines à domaine PDZ car la mutation de ce dernier fait en sorte que la spinophiline est incapable d'interagir avec la queue C-terminale. De plus, les résultats semblent démontrer que cette interaction *in vitro* ne pourrait que se faire qu'avec la présence de GABA_{B2} *in vivo*. En effet, les images de microscopie confocale montrent que l'expression seule de la spinophiline ne permet pas la présence de GABA_{B1} à la membrane cellulaire. La présence de GABA_{B2} est essentielle pour que le récepteur GABA_{B1} et la spinophiline se retrouvent tous les deux à la membrane cytoplasmique.

Les matériels et la méthodologie sont les mêmes que ceux utilisés dans l'article, sauf pour la technique de GST pulldown qui est décrite dans Robillard et al, 2000⁹². Les constructions utilisées sont : la queue C-terminale de GABA_{B1} WT (103 acides aminés) avec le GST en amont, la queue C-terminale de GABA_{B1} avec les trois derniers acides aminés mutés (LYK→AAA) avec le GST en amont et la queue C-terminale de GABA_{B2} (197 acides aminés) avec le GST en amont. 25 µg de protéines de fusion ont été utilisés pour faire le pull down dans chaque condition. Les cellules étaient transfectées avec la spinophiline qui portait un épitope

Myc. La révélation de l'immunobuvardage de type western s'est faite de la même façon que décrite dans l'article. L'anticorps monoclonal Myc provient de Covance.

Les expériences de microscopie confocale ont été effectuées de la même manière que décrite dans l'article. Les anticorps utilisés sont anti-GABAB1 (cochon d'inde, Biomol), et anti-myc (monoclonal, Covance) pour la spinophiline.

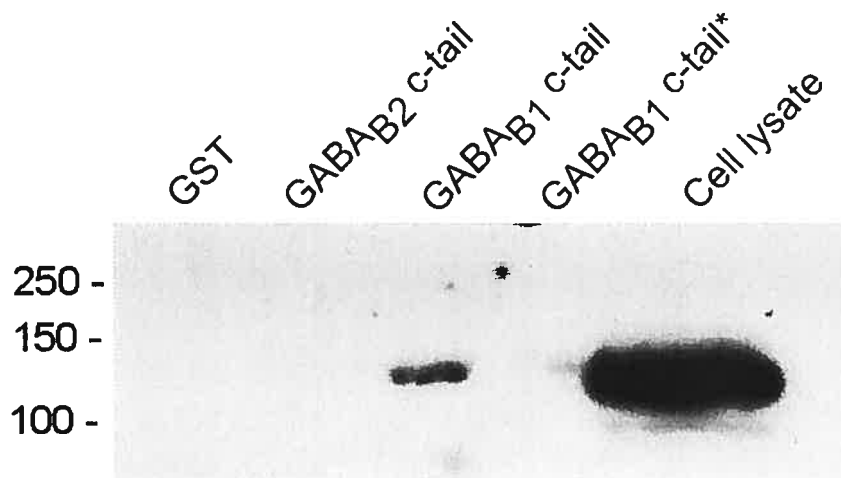
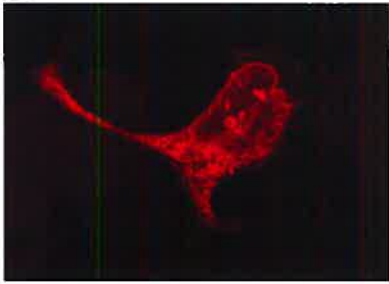
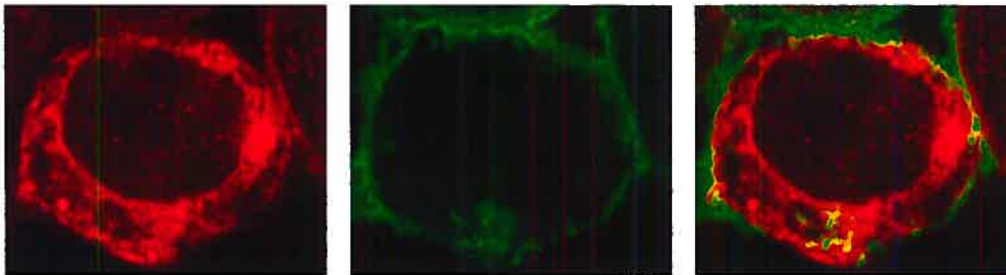


Figure 9 : Interaction de la spinophiline avec le récepteur GABA_{B1}. Interaction entre la queue C-terminale du récepteur GABA_{B1} et la spinophiline co-exprimés transitoirement dans les cellules HEK 293 montré par GST pulldown suivi d'un Western blot (n=3). La spinophiline interagit avec le récepteur GABA_{B1} via un motif PDZ. La queue C-terminale de GABA_{B1} (c-tail*) qui contient une mutation dans cette région particulière (LYK→AAA) est incapable d'interagir avec la spinophiline.

A



B



C

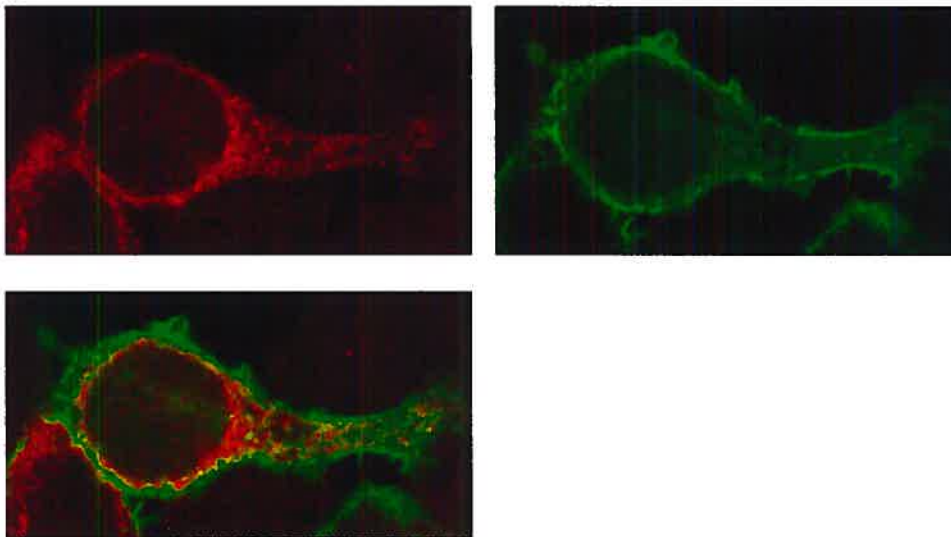


Figure 10 : Co-localisation de la spinophiline avec le récepteur GABA_{B1}. *A* Localisation du récepteur GABA_{B1} (rouge) exprimé transitoirement dans les cellules HEK 293 tel que vu en microscopie confocale. *B* La co-expression de la spinophiline (vert) ne semble pas affecter la localisation du récepteur GABA_{B1}. *C* Mutation dans le domaine PDZ (LYK→AAA) de GABA_{B1}.

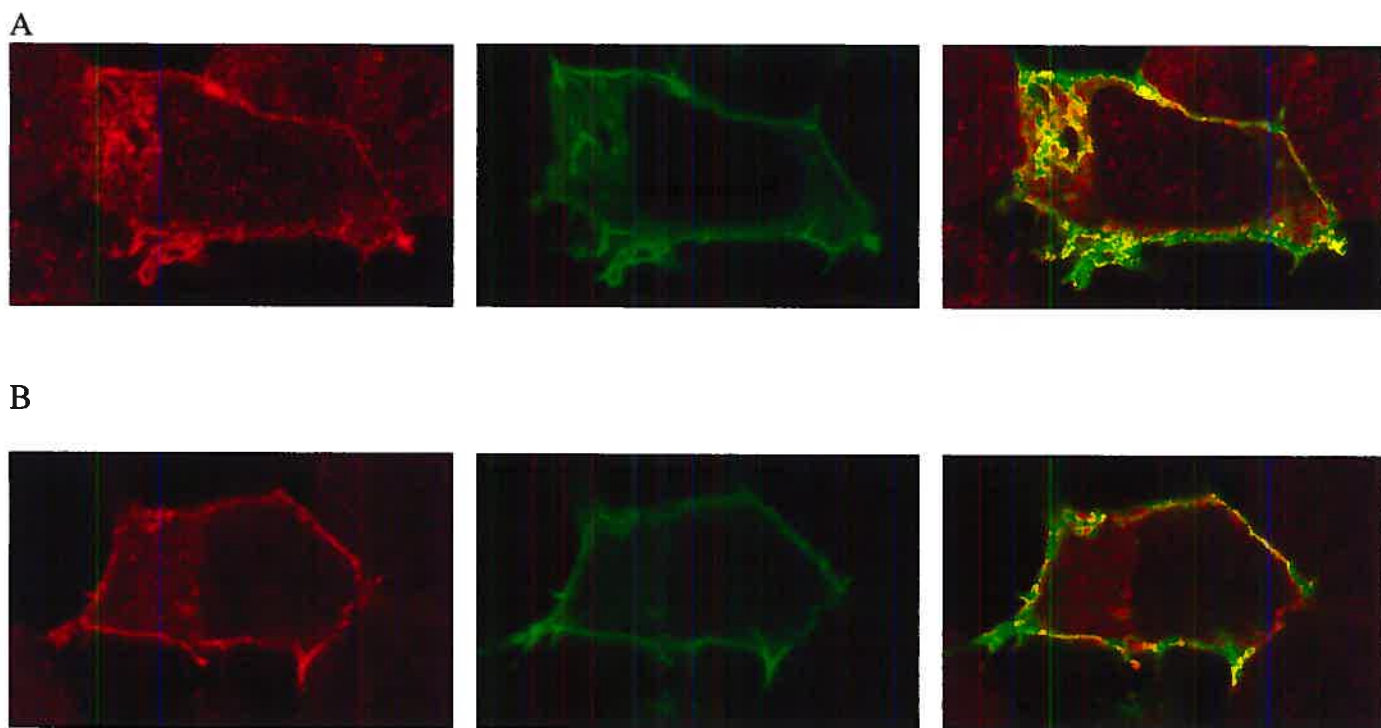


Figure 11 : Co-localisation de la spinophiline avec le récepteur GABA_{B1} en présence de GABA_{B2} . *A* Localisation du récepteur GABA_{B1} (rouge) et de la spinophiline (vert) exprimé transitoirement avec GABA_{B2} (non montré) dans les cellules HEK 293 tel que vu en microscopie confocale. *B* Mutation dans le domaine PDZ (LYK→AAA) de GABA_{B1} .

CHAPITRE 4. DISCUSSION GÉNÉRALE

4.1 Caractérisation des complexes de signalisation GABAergiques

Les résultats montrés ici démontrent clairement l'existence d'un complexe protéique entre les différentes protéines impliquées dans la signalisation associée au récepteur GABA_B qui est formé à l'intérieur de la cellule, avant son acheminement à la surface membranaire. En effet, comme plusieurs RCPG, GABA_{B1} semble faire partie d'un complexe protéique stable avec son effecteur et la protéine G. L'existence d'un tel complexe assure à la signalisation une spécificité et une rapidité très importantes. En effet, les études qui démontrent les effets de ce genre de complexe sont de plus en plus fréquente. Par exemple, plusieurs études démontrent que la protéine G peut affecter l'activité d'un effecteur tout en restant associé avec un RCPG.^{93, 94, 95} Les résultats montrent ici qu'un tel complexe existe pour GABA_B en l'absence de stimulation du récepteur. D'autres résultats démontrent la même chose pour d'autres RCPG.^{96, 97}

4.1.1 Interaction du récepteur avec l'effecteur

Les résultats présents dans l'article montre avec évidence l'existence d'un complexe protéique entre le récepteur GABA_{B1} et les différentes sous-unités du canal Kir3. En effet, les techniques de BRET, d'immunoprécipitation et de microscopie confocale montrent clairement que GABA_{B1} interagit autant à l'intérieur qu'à la membrane de la cellule avec Kir3.1. Cependant, l'expression de GABA_{B2} ou de Kir3.4 permet d'amener son partenaire naturel vers la membrane cellulaire, laissant l'autre protéine à l'intérieur de la cellule. Il semble donc qu'il y a deux signaux (ie. GABA_{B2} et Kir3.4) d'exportations pour que le complexe formé entre GABA_{B1} et Kir3.1 soit fonctionnel à la membrane cellulaire. Il y aurait donc une interaction entre le récepteur et l'effecteur dans le RE, dissociation de ce complexe lors de l'exportation membranaire et réassociation à la membrane plasmique. Pour ce qui est de Kir3.2, l'interaction semble se produire à la membrane cytoplasmique, puis que cette protéine se rend directement à la

membrane. Bien que les deux protéines GABA_{B1} et Kir3.2 semblent interagir sans distinction quant à la localisation cellulaire, la présence de GABA_{B2} stabilise le complexe, qui résiste aux conditions de solubilisation requises pour la co-immunoprécipitation. D'ailleurs, c'est l'hétérodimère GABA_B qui est reconnu dans la littérature pour contrôler l'action de Kir3.^{32, 33} Il est important de mentionner que les expériences de BRET ont été fait avec des quantités de protéines compétitrices qui n'affectaient pas l'expression des protéines fusionnées (GFP-10 et Luc) (données non-montrées).

4.1.2 Interaction du récepteur avec la protéine G

En utilisant les mêmes techniques expérimentales, il a été possible de démontrer que le récepteur GABA_{B1} interagissait aussi avec le dimère Gβγ de la protéine G. En effet, un complexe de signalisation ne pourrait pas être fonctionnel si la protéine G n'était pas présente. Comme avec Kir3.1, l'interaction entre GABA_{B1} et Gβγ semble se produire à l'intérieur de la cellule, puisqu'elle existe en l'absence de GABA_{B2}. L'absence d'expression stochiométrique de la sous-unité Gα fait en sorte que les sous-unités Gβγ restent plus au réticulum endoplasmique. Cependant, l'expression de la sous-unité Gα permet une localisation membranaire de Gβγ. Combiné à l'expression de GABA_{B2}, il semble que l'interaction entre la protéine G et GABA_{B1} puisse aussi exister à la membrane cytoplasmique. Toutefois, il est important de mentionner que les techniques utilisées démontrent une interaction qui n'est pas nécessairement directe entre les deux protéines. Des études de GST pulldown avec des protéines purifiées pourraient venir confirmer ou infirmer l'interaction directe entre les protéines impliquées. De plus, il est important de noter que la saturabilité des signaux BRET observés puisse être due à la présence des protéines impliqués dans la transmission d'énergie dans un domaine membranaire comme un

radeau lipidique. Il est donc primordial de faire les contrôles nécessaires pour éviter cette situation.

4.1.3 Itinéraire du dimère GABA_{B1-B2}

En utilisant des formes dominantes négatives des protéines GTPases Rab, protéines impliquées dans la formation des vésicules entre les différents organites de maturation des protéines sécrétées et membranaires, il a été possible de caractériser un peu le chemin emprunté par l'hétérodimère GABA_{B1-B2}. Les images de microscopie confocale montrent que le dimère peut emprunter différentes voies vers la membrane cellulaire. En effet, bien que la voie vers la membrane soit la même, les protéines impliquées dans l'acheminement de GABA_{B1-B2} peuvent être différentes, peut-être en fonction des autres protéines qui sont associées avec le récepteur. Les GTPases Rab redondantes entre les différentes organelles semblent toutes impliquées dans l'itinéraire de GABA_{B1-B2}, montrant l'importance de ces dernières dans le trafic des protéines membranaires vers la membrane cellulaire. Cependant, ces étapes peuvent aussi permettre l'existence de points de vérification pour l'assemblage d'un complexe protéique associée à GABA_B. L'implication et l'effet observé de GTPases qui sont redondantes porte à croire que l'hétérodimère GABA_B peut être emprunté divers chemins vers la membrane plasmique selon les protéines avec lesquelles il serait associé dans un contexte cellulaire donné. En effet, puisque que l'hétérodimère GABA_B n'amène pas toutes les sous-unités Kir3.1 à la surface membranaire (et inversement, Kir 3.1/3.4 n'amène pas toutes les récepteur GABA_{B1} à la surface), il est possible que différentes routes sont possibles et peuvent impliquer des GTPases Rab/Sar1 différentes.

4.1.4 Existence d'un homodimère GABA_{B1}

Si un tel récepteur est présent en grande quantité dans certains types cellulaires en l'absence, c'est qu'il doit avoir un rôle particulier dans le fonctionnement cellulaire. L'existence de GABA_{B1} sous la forme d'un homodimère est très intéressante. L'homodimère provoquerait son action à l'intérieur de la cellule. En effet, d'autres expériences du laboratoire⁹⁸ ont montré qu'en l'absence de GABA_{B2}, les agonistes de GABA_{B1} étaient capables d'activer la voie ERK1/2 MAP Kinase d'une façon transitoire, rapide et dose dépendante. Ce résultat est fort intéressant et peut être attribué à l'existence de l'homodimère GABA_{B1}.

4.1.5 Interaction du récepteur avec une protéine d'échafaudage

Un complexe de protéines qui sert dans la signalisation cellulaire peut contenir plusieurs sortes de protéines. Comme mentionné plus haut, la spinophiline est une protéine d'échafaudage idéale pour interagir avec le récepteur GABA_{B1}. En effet, elle se situe dans les dendrites et elle contient un domaine PDZ, domaine qui peut être reconnu par la queue C-terminale de GABA_{B1}. Une technique *in vitro* (GST pulldown) a permis de montrer que les deux protéines pouvaient potentiellement interagir ensemble, vraisemblablement via le domaine PDZ. Cependant, les résultats de microscopie confocale portent à croire que l'interaction *in vivo* requiert la présence de GABA_{B2} pour la localisation membranaire de GABA_{B1}. Il a déjà été démontré que la spinophiline pouvait interagir avec d'autres RCPG tel que le récepteur adrénergique α^{84} et le récepteur à la dopamine.⁹⁹ Elle a entre autre comme rôle de stabiliser la présence des récepteurs à la membrane cellulaire.

L'interaction du récepteur GABA_{B1} avec plusieurs protéines montre clairement qu'il existe des complexes protéiques qui sont associés à la signalisation cellulaire. Il existe probablement plusieurs complexes protéiques dans un type cellulaire donné puisqu'il faut assurer la spécificité

et la rapidité de la transmission de l'information. Par exemple, les canaux potassiques Kir sont impliqués dans plusieurs phénomènes tels que l'excitabilité membranaire, le rythme cardiaque, la relâche d'insuline et autres.¹⁰⁰ Il est donc pratiquement impensable que ce canal réussisse à être spécifique par lui-même. C'est son association avec d'autres protéines qui vont lui permettre d'accomplir son rôle adéquatement. Aussi, l'existence d'un homodimère GABA_{B1} montre bien l'importance de l'association des différentes protéines entre elles. En effet, le récepteur GABA_{B1} n'aura pas le même rôle dans la cellule s'il fait partie de différents complexes. Toute la complexité de la signalisation cellulaire s'illustre facilement par le nombre de récepteurs, de protéines G et d'effecteur présents dans un même type cellulaire. La formation et l'acheminement à la membrane des différents complexes protéiques de signalisation prennent alors toute son importance pour permettre à la cellule de répondre adéquatement à un stimulus donné.

4.2 Directions futures

Les résultats montrés ici jettent un peu de lumière sur l'existence d'un complexe protéique associé au récepteur GABA_B. Cependant, plusieurs questions demeurent sans réponses et seraient intéressantes d'être adressées.

4.2.1 Sites d'interaction entre les différentes protéines

L'interaction entre le récepteur GABA_{B1} et le canal potassique Kir3.1 semble survenir au niveau du réticulum endoplasmique puisque GABA_{B1} possède un motif de rétention au RE et Kir3.1 ne possède pas de signal d'exportation vers la membrane. L'interaction observée se produit donc à l'intérieur de la cellule. Cependant, bien qu'elle soit assez forte pour résister à la solubilisation nécessaire à la co-immunoprécipitation, il ne semble pas qu'elle peut résister complètement à la présence d'un des partenaires de signalisation (GABA_{B2} ou Kir 3.4). Cependant, lorsque les

quatre partenaires sont présents, l'interaction est de nouveau présente, à la membrane cellulaire, comme le montre les images de microscopie confocale. Il est donc légitime de se demander si les sites d'interactions entre GABA_{B1} et Kir3.1 sont les mêmes il sont à l'intérieur de la cellule comparativement à l'extérieur de la cellule. En effet, l'interaction qui survient à l'intérieur de la cellule pourrait se produire à un site différent que celle qui se produit lorsque les protéines sont à la membrane plasmique. La présence des protéines partenaires (GABA_{B2} et Kir 3.4) pourrait changer la conformation des deux autres protéines impliquées, provoquant soit une stabilisation, soit une déstabilisation du complexe. Aussi, leurs présences peuvent masquer le site d'interaction qui était accessible lorsque le récepteur GABA_{B1} et la sous-unité Kir3.1 étaient à l'intérieur de la cellule.

De plus, l'implication des protéines G est aussi à considérer dans la formation d'un tel complexe. Comme le montre les résultats de BRET et de co-immunoprécipitation, l'association de Gβγ à GABA_{B1} semble survenir à l'intérieur de la cellule. Ces résultats laissent supposer que Gβγ peut être essentielle à l'interaction entre GABA_{B1} et Kir3. En effet, les protéines G étant présentes dans le système de surexpression utilisé, il est possible que les sous-unités Gβγ soient impliquées dans l'interaction entre GABA_{B1} et Kir3 dans les expériences visant seulement le récepteur et la protéine effectrice. Aussi, il serait logique que Gβγ soit présent puisqu'ils interagissent avec le récepteur et qu'elles sont essentielles à la signalisation. Toutefois, les résultats obtenus ne permettent pas de confirmer cette hypothèse. Il serait donc intéressant d'examiner l'importance de Gβγ dans l'interaction entre GABA_{B1} et Kir3.

Les techniques utilisées ici démontrent une interaction entre les différentes protéines qui n'est pas nécessairement directe. L'utilisation d'une technique tel que le GST pulldown avec des protéines purifiées pourrait venir clarifier si les interaction montrées ici sont directes ou non.

4.2.2 Exportation membranaire du complexe

Les résultats de microscopie confocale permettent de voir que les différents partenaires du complexe protéique semblent être dirigés séparément à la membrane. En effet, l'expression de GABA_{B2} amène GABA_{B1} à la membrane, laissant Kir3.1 à l'intérieur. Le contraire est aussi vrai : l'expression de Kir3.4 amène Kir3.1 à la membrane mais laisse GABA_{B1} à l'intérieur. Toutefois, les protéines exprimées seules (GABA_{B1} et Kir3.1 ensemble) interagissent à l'intérieur de la cellule. L'acheminement à la membrane des différentes protéines semble donc emprunter des chemins différents qui restent cependant à caractériser. Les résultats de microscopie confocale montrent que certaines protéines Rab sont impliquées pour GABA_{B1-B2}, mais rien n'est encore connu à propos de Kir3.1-3.4. Il serait donc intéressant de caractériser l'implication des Rab dans l'acheminement du canal potassique, en plus de préciser les différents chemins que semblent prendre l'hétérodimère GABA_{B1-B2}.

4.2.3 Interaction *in vivo* de la spinophiline

Les résultats préliminaires montrés ici à propos de la spinophiline démontrent qu'il existe potentiellement une interaction entre GABA_{B1} et la protéine d'échafaudage. L'interaction semble cependant requérir GABA_{B2} afin d'avoir la bonne localisation de GABA_{B1}. Il serait donc grandement intéressant de vérifier cette interaction *in vivo*. Des expériences de co-immunoprécipitation et de BRET pourraient venir démontrer ou infirmer l'hypothèse qu'amène les résultats ici présent. De plus, si il y a vraiment une interaction entre le récepteur et la spinophiline *in vivo*, il serait possible que cette dernière possède une autre fonction, autre que celle de protéine d'échafaudage. En effet, il a déjà été démontré que la spinophiline pouvait compétitionner la protéine arrestine pour lier les RCPG.⁸⁹ Il se pourrait donc que la spinophiline joue un rôle dans la désensibilisation du récepteur GABA_{B1}.

4.2.4 Présence d'autres protéines

Un complexe de signalisation protéique peut contenir potentiellement plusieurs protéines impliquées dans la voie de signalisation. Par exemple, des protéines impliquées dans la désensibilisation du récepteur à la suite de son activation pourraient être présentes dans un complexe de signalisation complet. D'ailleurs, il est fort possible que le complexe protéique associé au récepteur soit grandement différent avant et après la désensibilisation du récepteur. Dans les faits, on pourrait peut-être éventuellement parler de deux complexes protéiques différents. Aussi, la présence d'un certain nombre de protéines dans un tel complexe est limitée par des considérations physiques. En effet, la grosseur et le volume occupé par les différentes protéines fait en sorte que l'espace alentours d'un récepteur peut-être vite totalement occupée. D'autres études d'interaction protéine-protéine pourront être effectuées dans le but de trouver et de caractériser ces différentes protéines et leurs rôles dans les complexes. Ces protéines pourront être présentes avant, pendant ou après la stimulation du récepteur ou sa désensibilisation.

4.2.5 Effet d'un agoniste et d'un antagoniste

L'interaction observée entre les différents membres du complexe de signalisation est présente en l'absence d'agoniste pour le récepteur. La présence d'un ligand changerait peut-être la situation. En effet, la présence d'un agoniste pourrait peut-être changer la force d'interaction entre le récepteur, les différentes sous-unités de la protéine G et le canal potassique. En se liant au récepteur et en entraînant la cascade de signalisation, les interactions entre GABA_B et les sous-unités G $\beta\gamma$ peuvent être modifiées. De la même manière, les interactions entre GABA_B et l'effecteur Kir peuvent être changées. De plus, la présence d'un antagoniste pourrait aussi potentiellement changer la force d'interaction entre les partenaires de signalisation. Des expériences de BRET₅₀ (valeur proportionnel à une constante de dissociation) pourraient

démontrer un tel phénomène. En gardant la proportion de partenaire luciférase et en variant la proportion de partenaire GFP, il est possible de déterminer la valeur du $BRET_{50}$ et il est possible d'évaluer l'affinité des deux partenaires dans différentes conditions, par exemple en l'absence et en la présence d'agoniste ou d'antagoniste.

4.3 Conclusion

Le présent projet de recherche permet d'identifier l'existence d'un complexe protéique de signalisation entre le récepteur $GABA_{B1}$, les sous-unités de la protéine G et l'effecteur Kir3, et ce, en l'absence d'activation du récepteur. De plus, il permet de confirmer l'existence d'un homodimère $GABA_{B1}$ qui possède un rôle à l'intérieur de la cellule. Enfin, il ouvre la voie à une possible interaction fonctionnelle entre la protéine d'échafaudage spinophiline et $GABA_{B1}$. Cependant, ce que le projet de recherche réussi le mieux à montrer, c'est l'importance pour la cellule de créer des complexes de signalisation pour accomplir son rôle adéquatement. En effet, l'existence d'interactions stables entre les protéines d'un complexe de signalisation cellulaire, et ce, à l'intérieur de la cellule, permet à la signalisation cellulaire d'être précise, spécifique et rapide.

RÉFÉRENCES

- 1 Erhlich, P., *Lancet*, 1913 p. 445-451.
- 2 Hermans E. Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther.* 2003 Jul; 99(1):25-44.
- 3 Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*. 2000 Aug 4; 289(5480):739-45
- 4 Bouvier M. Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci.* 2001 Apr; 2(4):274-86.
- 5 Hebert TE, Bouvier M. Structural and functional aspects of G protein-coupled receptor oligomerization. *Biochem Cell Biol.* 1998; 76(1):1-11.
- 6 Lee SP, O'Dowd BF, George SR. Homo- and hetero-oligomerization of G protein-coupled receptors. *Life Sci.* 2003 Dec 5; 74(2-3):173-80
- 7 Gether U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev.* 2000 Feb; 21(1):90-113.
- 8 Bockaert J, Pin JP. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* 1999 Apr 1; 18(7):1723-9.
- 9 McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM., RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature.* 1998 May ;393(6683):333-9.
- 10 Buhlmann N, Leuthauser K, Muff R, Fischer JA, Born W. A receptor activity modifying protein (RAMP)2-dependent adrenomedullin receptor is a calcitonin gene-related peptide receptor when coexpressed with human RAMP1. *Endocrinology.* 1999 Jun ;140(6):2883-90
- 11 Tang CM, Insel PA. GPCR expression in the heart; "new" receptors in myocytes and fibroblasts. *Trends Cardiovasc Med.* 2004 Apr ;14(3):94-9
- 12 Wettschureck N, Offermanns S. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev.* 2005 Oct; 85(4):1159-204.
- 13 Gales C, Rebois RV, Hogue M, Trieu P, Breit A, Hebert TE, Bouvier M. Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat Methods.* 2005 Mar; 2(3):177-84
- 14 Azpiazu I, Gautam N. (2004) A fluorescence resonance energy transfer-based sensor indicates that receptor access to a G protein is unrestricted in a living mammalian cell. *J Biol Chem* 279, 27709-27718

-
- 15 Frank M, Thumer L, Lohse MJ, Bunemann M. G Protein activation without subunit dissociation depends on a G{alpha}(i)-specific region. *J Biol Chem*. 2005 Jul 1; 280(26):24584-90
- 16 George SR, Fan T, Xie Z, Tse R, Tam V, Varghese G, O'Dowd BF. Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties. *J Biol Chem*. 2000 Aug 25; 275(34):26128-35.
- 17 AbdAlla S, Lothar H, Quitterer U. AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature*. 2000 Sep 7; 407(6800):94-8.
- 18 De Vries L, Zheng B, Fischer T, Elenko E, Farquhar MG. The regulator of G protein signaling family. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2000; 40:235-71
- 19 Nurse S, Lacaille JC. Do GABAA and GABAB inhibitory postsynaptic responses originate from distinct interneurons in the hippocampus? *Can J Physiol Pharmacol*. 1997 May; 75(5):520-5.
- 20 Luscher C, Jan LY, Stoffel M, Malenka RC, Nicoll RA. G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron*. 1997 Sep;19(3):687-95
- 21 Schuler V, Luscher C, Blanchet C, Klix N, Sansig G, Klebs K, Schmutz M, Heid J, Gentry C, Urban L, Fox A, Spooren W, Jatton AL, Vigouret J, Pozza M, Kelly PH, Mosbacher J, Froestl W, Kaslin E, Korn R, Bischoff S, Kaupmann K, van der Putten H, Bettler B. Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABAB responses in mice lacking GABAB1. *Neuron*. 2001 Jul 19; 31(1):47-58.
- 22 Lambert NA, Wilson WA. High-threshold Ca²⁺ currents in rat hippocampal interneurons and their selective inhibition by activation of GABAB receptors. *J Physiol*. 1996 Apr 1; 492 (Pt 1):115-27.
- 23 Benes FM, Berretta S. GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology*. 2001 Jul; 25(1):1-27.
- 24 Billinton A, Ige AO, Bolam JP, White JH, Marshall FH, Emson PC. Advances in the molecular understanding of GABAB receptors. *Trends Neurosci*. 2001 May; 24(5):277-82.
- 25 Fritschy JM, Meskenaite V, Weinmann O, Honer M, Benke D, Mohler H. GABAB-receptor splice variants GB1a and GB1b in rat brain: developmental regulation, cellular distribution and extrasynaptic localization. *Eur J Neurosci*. 1999 Mar; 11(3):761-8.
- 26 Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J, Gassmann M. Molecular structure and physiological functions of GABAB receptors. *Physiol Rev*. 2004 Jul; 84(3):835-67.

-
- 27 Kaupmann K, Huggel K, Heid J, Flor PJ, Bischoff S, Mickel SJ, McMaster G, Angst C, Bittiger H, Froestl W, Bettler B. Expression cloning of GABAB receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature*. 1997 Mar 20; 386(6622):239-46
- 28 Margeta-Mitrovic M, Jan YN, Jan LY. A trafficking checkpoint controls GABAB receptor heterodimerization. *Neuron*. 2000 Jul; 27(1):97-106
- 29 Pagano A, Rovelli G, Mosbacher J, Lohmann T, Duthey B, Stauffer D, Ristig D, Schuler V, Meigel I, Lampert C, Stein T, Prezeau L, Blahos J, Pin J, Froestl W, Kuhn R, Heid J, Kaupmann K, Bettler B. C-terminal interaction is essential for surface trafficking but not for heteromeric assembly of GABAB receptors. *J Neurosci*. 2001 Feb 15; 21(4):1189-202.
- 30 Calver AR, Robbins MJ, Cosio C, Rice SQ, Babbs AJ, Hirst WD, Boyfield I, Wood MD, Russell RB, Price GW, Couve A, Moss SJ, Pangalos MN. The C-terminal domains of the GABAB receptor subunits mediate intracellular trafficking but are not required for receptor signaling. *J Neurosci*. 2001 Feb 15; 21(4):1203-10.
- 31 Malitschek B, Ruegg D, Heid J, Kaupmann K, Bittiger H, Froestl W, Bettler B, Kuhn R. Developmental changes of agonist affinity at GABABR1 receptor variants in rat brain. *Mol Cell Neurosci*. 1998 Sep; 12(1-2):56-64.
- 32 Jones KA, Borowsky B, Tamm JA, Craig DA, Durkin MM, Dai M, Yao WJ, Johnson M, Gunwaldsen C, Huang LY, Tang C, Shen Q, Salon JA, Morse K, Laz T, Smith KE, Nagarathnam D, Noble SA, Branchek TA, Gerald C. GABAB receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABAB1 and GABAB2. *Nature*. 1998 Dec 17; 396(6712):674-9.
- 33 Kaupmann K, Malitschek B, Schuler V, Heid J, Froestl W, Beck P, Mosbacher J, Bischoff S, Kulik A, Shigemoto R, Karschin A, Bettler B. GABAB receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature*. 1998 Dec 17; 396(6712):683-7.
- 34 Martin SC, Russek SJ, Farb DH. Molecular identification of the human GABABR2: cell surface expression and coupling to adenylyl cyclase in the absence of GABABR1. *Mol Cell Neurosci*. 1999 Mar; 13(3):180-91.
- 35 White JH, Wise A, Main MJ, Green A, Fraser NJ, Disney GH, Barnes AA, Emson P, Foord SM, Marshall FH. Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature*. 1998 Dec 17; 396(6712):679-82.
- 36 Berthele A, Platzer S, Weis S, Conrad B, Tolle TR. Expression of GABAB1 and GABAB2 mRNA in the human brain. *Neuroreport*. 2001 Oct 29; 12(15):3269-75.
- 37 Couve A, Moss SJ, Pangalos MN. GABAB receptors: a new paradigm in G protein signaling. *Mol Cell Neurosci*. 2000 Oct; 16(4):296-312

-
- 38 Ferguson SS, Barak LS, Zhang J, Caron MG. G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Can J Physiol Pharmacol.* 1996 Oct; 74(10):1095-110
- 39 Goodman OB Jr, Krupnick JG, Gurevich VV, Benovic JL, Keen JH. Arrestin/clathrin interaction. Localization of the arrestin binding locus to the clathrin terminal domain. *J Biol Chem.* 1997 Jun 6; 272(23):15017-22
- 40 Laporte SA, Oakley RH, Zhang J, Holt JA, Ferguson SS, Caron MG, Barak LS. The β 2-adrenergic receptor/beta-arrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 30; 96(7):3712-7.
- 41 Laporte SA, Oakley RH, Holt JA, Barak LS, Caron MG. The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *J Biol Chem.* 2000 Jul 28; 275(30):23120-6.
- 42 Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ. G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem.* 1998; 67:653-92.
- 43 Ambrose C, James M, Barnes G, Lin C, Bates G, Altherr M, Duyao M, Groot N, Church D, Wasmuth JJ. A novel G protein-coupled receptor kinase gene cloned from 4p16.3. *Hum Mol Genet.* 1992 Dec; 1(9):697-703.
- 44 Virlon B, Firsov D, Cheval L, Reiter E, Troispoux C, Guillou F, Elalouf JM. Rat G protein-coupled receptor kinase GRK4: identification, functional expression, and differential tissue distribution of two splice variants. *Endocrinology.* 1998 Jun; 139(6):2784-95.
- 45 Perroy J, Adam L, Qanbar R, Chenier S, Bouvier M. Phosphorylation-independent desensitization of GABAB receptor by GRK4. *EMBO J.* 2003 Aug 1; 22(15):3816-24.
- 46 Ma D, Zerangue N, Raab-Graham K, Fried SR, Jan YN, Jan LY. Diverse trafficking patterns due to multiple traffic motifs in G protein-activated inwardly rectifying potassium channels from brain and heart. *Neuron.* 2002 Feb 28; 33(5):715-29.
- 47 Corey S, Clapham DE. Identification of native atrial G-protein-regulated inwardly rectifying K⁺ (GIRK4) channel homomultimers. *J Biol Chem.* 1998 Oct 16; 273(42):27499-504.
- 48 Chan KW, Sui JL, Vivaudou M, Logothetis DE. Control of channel activity through a unique amino acid residue of a G protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Nov 26; 93(24):14193-8.
- 49 Mirshahi T, Logothetis DE. GIRK Channel Trafficking: Different Paths for Different Family Members. *Mol Interv.* 2002 Sep; 2(5):289-91.
- 50 Clapham DE, Neer EJ. G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1997; 37:167-203.

-
- 51 Stanfield PR, Nakajima S, Nakajima Y., Constitutively active and G-protein coupled inward rectifier K⁺ channels: Kir2.0 and Kir3.0. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2002; 145:47-179
- 52 Corey S, Clapham DE. The Stoichiometry of G β gamma binding to G-protein-regulated inwardly rectifying K⁺ channels (GIRKs). *Biol Chem.* 2001 Apr 6; 276(14):11409-13.
- 53 Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. The open pore conformation of potassium channels. *Nature.* 2002 May 30; 417(6888):523-6.
- 54 Zhou Y, Morais-Cabral JH, Kaufman A, MacKinnon R. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature.* 2001 Nov 1; 414(6859):43-8.
- 55 Sadja R, Smadja K, Alagem N, Reuveny E. Coupling G β γ -dependent activation to channel opening via pore elements in inwardly rectifying potassium channels. *Neuron.* 2001 Mar; 29(3):669-80.
- 56 Fain GL, Matthews HR, Cornwall MC. Dark adaptation in vertebrate photoreceptors. *Trends Neurosci.* 1996 Nov; 19(11):502-7.
- 57 Hamm HE. How activated receptors couple to G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Apr 24;98(9):4819-21
- 58 Meng EC, Bourne HR. Receptor activation: what does the rhodopsin structure tell us? *Trends Pharmacol Sci.* 2001 Nov; 22(11):587-93
- 59 Steinberg SF, Brunton LL. Compartmentation of G protein-coupled signaling pathways in cardiac myocytes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001; 41:751-73.
- 60 Lachance M, Ethier N, Wolbring G, Schnetkamp PP, Hebert TE Stable association of G proteins with beta 2AR is independent of the state of receptor activation. *Cell Signal.* 1999 Jul; 11(7):523-33
- 61 Gu YZ, Schonbrunn A. Coupling specificity between somatostatin receptor sst2A and G proteins: isolation of the receptor-G protein complex with a receptor antibody. *Mol Endocrinol.* 1997 May; 11(5):527-37
- 62 Okuma Y, Reisine T. Immunoprecipitation of α 2a-adrenergic receptor-GTP-binding protein complexes using GTP-binding protein selective antisera. Changes in receptor/GTP-binding protein interaction following agonist binding. *J Biol Chem.* 1992 Jul 25; 267(21):14826-31.
- 63 Prather PL, McGinn TM, Erickson LJ, Evans CJ, Loh HH, Law PY Ability of delta-opioid receptors to interact with multiple G-proteins is independent of receptor density. *J Biol Chem.* 1994 Aug 19; 269(33):21293-302.

-
- 64 Zhang J, Pratt RE. The AT₂ receptor selectively associates with G α ₂ and G α ₃ in the rat fetus. *J Biol Chem*. 1996 Jun 21; 271(25):15026-33.
- 65 Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Switching of the coupling of the β ₂-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature*. 1997 Nov 6; 390(6655):88-91.
- 66 Frank M, Thumer L, Lohse MJ, Bunemann M. G Protein activation without subunit dissociation depends on a G α (i)-specific region. *J Biol Chem*. 2005 Jul 1; 280(26):24584-90
- 67 Lavine N, Ethier N, Oak JN, Pei L, Liu F, Trieu P, Rebois RV, Bouvier M, Hebert TE, Van Tol HH. G protein-coupled receptors form stable complexes with inwardly rectifying potassium channels and adenylyl cyclase. *J Biol Chem*. 2002 Nov 29 ;277(48):46010-9
- 68 Hebert, T.E., et al. (2006) Detecting and imaging protein-protein interactions during G protein-mediated signal transduction in vivo and in situ by using fluorescence-based techniques. *Cell Biochem Biophys* 45, 85-109
- 69 Pfleger, K.D., and Eidne, K.A. (2006) Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nat Methods* 3, 165-174
- 70 Seabra MC, Mules EH, Hume AN. Rab GTPases, intracellular traffic and disease. *Trends Mol Med*. 2002 Jan; 8(1):23-30.
- 71 Segev N. Ypt and Rab GTPases: insight into functions through novel interactions. *Curr Opin Cell Biol*. 2001 Aug; 13(4):500-11.
- 72 Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Feb; 2(2):107-17
- 73 Pereira-Leal JB, Hume AN, Seabra MC. Prenylation of Rab GTPases: molecular mechanisms and involvement in genetic disease. *FEBS Lett*. 2001 Jun 8; 498(2-3):197-200
- 74 Alory C, Balch WE. Organization of the Rab-GDI/CHM superfamily: the functional basis for choroideremia disease. *Traffic*. 2001 Aug; 2(8):532-43
- 75 Filipeanu CM, Zhou F, Fugetta EK, Wu G. Differential Regulation of the Cell-Surface Targeting and Function of β - and α ₁-Adrenergic Receptors by Rab1 GTPase in Cardiac Myocytes. *Mol Pharmacol*. 2006 May; 69(5):1571-8
- 76 Gimelbrant AA, Haley SL, McClintock TS. Olfactory receptor trafficking involves conserved regulatory steps. *J Biol Chem*. 2001 Mar 9; 276(10):7285-90
- 77 Seachrist JL, Ferguson SS. Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis and trafficking by Rab GTPases. *Life Sci*. 2003 Dec 5; 74(2-3):225-35

78 Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Sep; 3(9):639-50.

79 Hall RA, Lefkowitz RJ. Regulation of G protein-coupled receptor signaling by scaffold proteins. *Circ Res.* 2002 Oct 18; 91(8):672-80

80 Bockaert J, Roussignol G, Becamel C, Gavarini S, Joubert L, Dumuis A, Fagni L, Marin P. GPCR-interacting proteins (GIPs): nature and functions. *Biochem Soc Trans.* 2004 Nov; 32(Pt 5):851-5

81 Bockaert J, Fagni L, Dumuis A, Marin P. GPCR interacting proteins (GIP). *Pharmacol Ther.* 2004 Sep; 103(3):203-21

82 Hall RA. Beta-adrenergic receptors and their interacting proteins. *Semin Cell Dev Biol.* 2004 Jun; 15(3):281-8

83 Hall RA, Lefkowitz RJ. Regulation of G protein-coupled receptor signaling by scaffold proteins. *Circ Res.* 2002 Oct 18; 91(8):672-80

84 Richman JG, Brady AE, Wang Q, Hensel JL, Colbran RJ, Limbird LE. Agonist-regulated Interaction between alpha2-adrenergic receptors and spinophilin. *J Biol Chem.* 2001 May 4; 276(18):15003-

85 Satoh A, Nakanishi H, Obaishi H, Wada M, Takahashi K, Satoh K, Hirao K, Nishioka H, Hata Y, Mizoguchi A, Takai Y. Neurabin-II/spinophilin. An actin filament-binding protein with one pdz domain localized at cadherin-based cell-cell adhesion sites. *J Biol Chem.* 1998 Feb 6; 273(6):3470-5.

86 Allen PB, Ouimet CC, Greengard P. Spinophilin, a novel protein phosphatase 1 binding protein localized to dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Sep 2; 94(18):9956-61.

87 Smith FD, Oxford GS, Milgram SL. Association of the D2 dopamine receptor third cytoplasmic loop with spinophilin, a protein phosphatase-1-interacting protein. *J Biol Chem.* 1999 Jul 9; 274(28):19894-900.

88 Richman JG, Brady AE, Wang Q, Hensel JL, Colbran RJ, Limbird LE. Agonist-regulated Interaction between alpha2-adrenergic receptors and spinophilin. *J Biol Chem.* 2001 May 4; 276(18):15003-8.

89 Wang Q, Zhao J, Brady AE, Feng J, Allen PB, Lefkowitz RJ, Greengard P, Limbird LE. Spinophilin blocks arrestin actions in vitro and in vivo at G protein-coupled receptors. *Science.* 2004 Jun 25; 304(5679):1940-4.

90 Rebois RV, Robitaille M, Galés C, Dupré DJ, Baragli A, Trieu P, Ethier N, Bouvier M, Hébert TE. Heterotrimeric G proteins form stable complexes with adenylyl cyclase and Kir3.1 channels in living cells. *J. Cell Sci.* In press.

-
- 91 Rebois RV, Robitaille M, Gales C, Dupre DJ, Baragli A, Trieu P, Ethier N, Bouvier M, Hebert TE. Heterotrimeric G proteins form stable complexes with adenylyl cyclase and Kir3.1 channels in living cells. *J Cell Sci.* 2006 Jul 1;119(Pt 13):2807-18.
- 92 Robillard L, Ethier N, Lachance M, Hebert TE. Gbetagamma subunit combinations differentially modulate receptor and effector coupling in vivo. *Cell Signal.* 2000 Oct; 12(9-10):673-82
- 93 Brown PJ, Schonbrunn A. Affinity purification of a somatostatin receptor-G-protein complex demonstrates specificity in receptor-G-protein coupling. *J Biol Chem.* 1993 Mar 25;268(9):6668-76.
- 94 Law SF, Yasuda K, Bell GI, Reisine T. Gi alpha 3 and G(o) alpha selectively associate with the cloned somatostatin receptor subtype SSTR2. *J Biol Chem.* 1993 May 25;268(15):10721-7.
- 95 Okuma Y, Reisine T. Immunoprecipitation of alpha 2a-adrenergic receptor-GTP-binding protein complexes using GTP-binding protein selective antisera. Changes in receptor/GTP-binding protein interaction following agonist binding. *J Biol Chem.* 1992 Jul 25;267(21):14826-31.
- 96 Bar-Sinai, A., Marbach, I., Engelberg, D., Abeliovich, H., and Levitzki, A. 1990. Transmembrane Signaling, Intracellular Messengers and Implication for Drug Development, S. R. Nahorski (Ed.). John Wiley and Sons, pp. 133-140.
- 97 Rebois RV, Warner DR, Basi NS. Does subunit dissociation necessarily accompany the activation of all heterotrimeric G proteins? *Cell Signal.* 1997 Feb;9(2):141-51.
- 98 Richer M, David M, Villeneuve L, Mamarbachi AM, Hébert TE. GABA-B1 Receptors are coupled to the ERK1/2 MAP Kinase Pathway in the Absence of GABA-B2 Subunits. To be submitted
- 99 Smith FD, Oxford GS, Milgram SL. 1999. Association of the D2 dopamine receptor third cytoplasmic loop with spinophilin, a protein phosphatase-1-interacting protein. *J. Biol. Chem.* 274:19894-900
- 100 Bichet D, Haass FA, Jan LY. Merging functional studies with structures of inward-rectifier K⁺ channels. *Nat Rev Neurosci.* 2003 Dec; 4(12):957-67